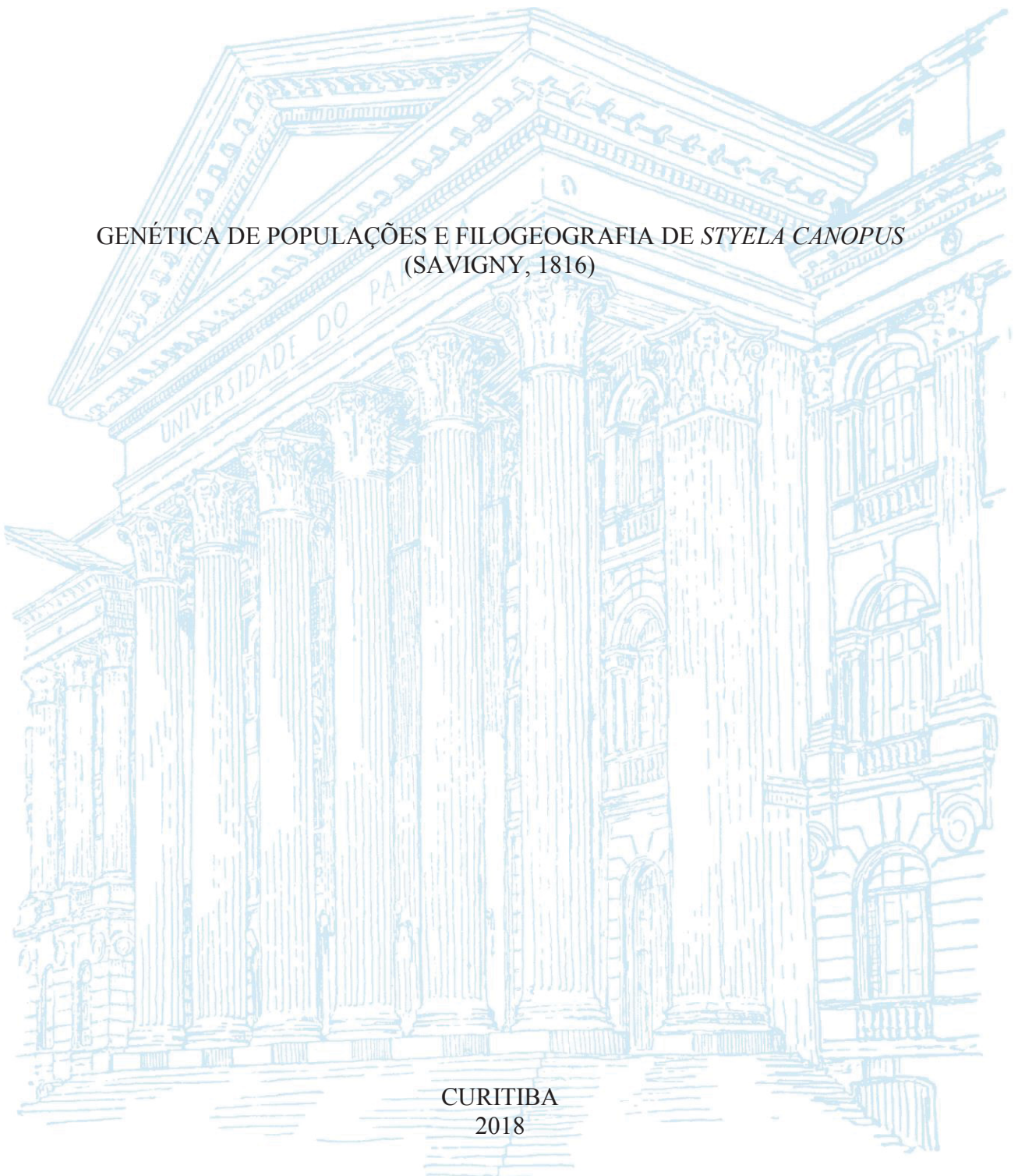


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RODOLFO CORRÊA DE BARROS

GENÉTICA DE POPULAÇÕES E FILOGEOGRAFIA DE *STYELA CANOPUS*  
(SAVIGNY, 1816)

CURITIBA  
2018



RODOLFO CORRÊA DE BARROS

GENÉTICA DE POPULAÇÕES E FILOGEOGRAFIA DE *STYELA CANOPUS*  
(SAVIGNY, 1816)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências na Área de Zoologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosana Moreira da Rocha

CURITIBA  
2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Barros, Rodolfo Corrêa de  
Genética de populações e filogeografia de *Styela canopus* (Savigny, 1816). / Rodolfo Corrêa de Barros. – Curitiba, 2018.  
105 f. : il. ; 30cm.

Orientadora: Rosana Moreira da Rocha  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

1. Genética de populações. 2. Filogeografia. 3. Ascidiacea. 4. Tunicata. I. Título. II. Rocha, Rosana Moreira da. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

CDD (20. ed.) 596.2



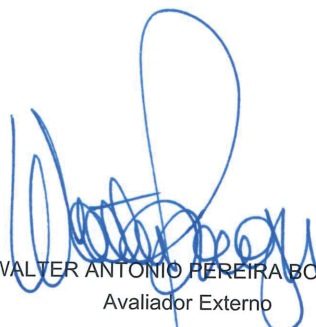
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOLOGIA

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **RODOLFO CORREA DE BARROS** intitulada: **Genética de populações e filogeografia de *Styela canopus* (Savigny, 1816)**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 28 de Junho de 2018.



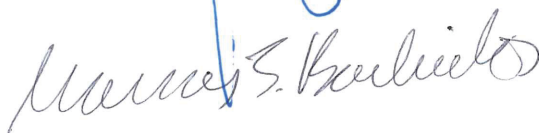
WALTER ANTONIO FERREIRA BOEGER  
Avaliador Externo



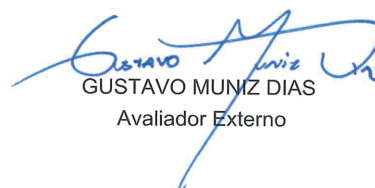
ROSANA MOREIRA DA ROCHA  
Presidente da Banca Examinadora



MARCIO ROBERTO PIE  
Avaliador Interno



MARCOS SOARES BARBEITOS  
Avaliador Interno



GUSTAVO MUNIZ DIAS  
Avaliador Externo

*Dedico este trabalho a minha esposa e filhos. Amo vocês!*

## AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos à Prof<sup>a</sup>. *Rosana Moreira da Rocha*. Obrigado “Ro” por aceitar o desafio de orientar este estudante *outlier*, pela persistente confiança e apoio e, acima de tudo, por ter sido referencial ao longo de minha formação acadêmica.

Ao Programa de Pós-graduação em Zoologia e ao Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná, por propiciarem a realização desta pesquisa através de infraestrutura, recursos materiais e de financiamento.

É imprescindível agradecer à *Serina Lee Siew Chen* e *Lim Chin Sing* (National University of Singapore), *Lauren Stefaniak* (Georgia Southern University), *Noa Shenkar* (Tel-Aviv University), *Gretchen Lambert* (University of Washington), *Marie Nydam* (Centre College), *Luis Felipe Skinner* (Universidade Estadual do Rio de Janeiro) e *Sandra Marisa Nobre de Andrade* (Luanda, Angola) pelo fundamental envio de amostras. Sem a inestimável ajuda desses pesquisadores este projeto não teria saído do papel. Meu muito obrigado a *Joke Bleeker* (Naturalis Biodiversity Center) pelo empréstimo de amostras que enriqueceram a presente tese.

Agradeço também à *Gilberto Caetano Manzoni* e *Heluiz Renato Leal* (Universidade do Vale do Itajaí, Centro Experimental de Maricultura), pelo apoio logístico durante as coletas em Penha, Santa Catarina.

Meu muito obrigado ao Prof. *Mário Navarro* pelo auxílio com equipamentos de pesquisa e pelas palavras de estímulo.

Aos colegas do Laboratório de Invertebrados Marinhos, *Nadia Yukiji Koto Bonnet*, *Gabriel Roehrig Pacheco*, *Nicolas Binneck Chierigatti*, *Daniel de Miranda Lins*, *Janaína de Araújo Bumbeer*, *Isabela Monteiro Neves* e *Pedro Meyer Tokoro* pela paciência e apoio ao longo desses quatro anos. Um especial agradecimento à *Joyce Ana Teixeira* e *Sandra Vieira Paiva* pela parceria empreendida com a Sistemática Molecular, a *Karen Alves de Oliveira* pelo auxílio na dissecação dos espécimes e a *Livia de Moura Oliveira*, que mesmo tendo seus afazeres de doutoranda nunca me negou ajuda, incluindo consultorias via *WhatsApp*.

À colega Bióloga *Paula A. F. Borges Bassi*, do Laboratório de Biologia Molecular - Departamento de Zoologia - UFPR, pela compreensão, paciência e pelas dicas salvadoras, e ao colega *Valter Antônio de Baura*, do Departamento de Bioquímica - UFPR, pelo auxílio com equipamentos e pela generosidade em compartilhar sua valiosa experiência com sequenciamento de DNA.

Meu muito obrigado à *Elaine Novakowski*, *Elisane Camargo de Souza Bachtzen*, *Isabel Hammerschmidt Perin* e *Marcia Valeria Costa Sales*, amigas do Setor de Imunoquímica do

Hospital de Clínicas - UFPR, pela infinita paciência que tiveram e por todo apoio que me deram. Serei sempre grato.

Um especial agradecimento à *Cristiane Maria Chemin*, amiga do Setor de Imunoquímica do Hospital de Clínicas - UFPR, que me instigou a continuar os estudos e a buscar o doutorado.

Meus sinceros agradecimentos à *Marisol Dominguez Muro* (Chefia da Unidade Laboratório de Análises Clínicas) e *Gislaine Custódio* (Chefia do Laboratório de Imunoquímica), por compreenderem a importância deste doutorado e por me ajudarem da forma que lhes foi possível.

Um “gigaimenso” obrigado aos alunos do curso de Ciências Biológicas da Universidade Positivo pela paciência que tiveram, respeitando meu cansaço e meus constantes lapsos de memória durante esses quatro anos.

Um especial agradecimento a *Eliete Garcia Rodrigues*, minha professora de alfabetização. Ao lembrá-la, desejo homenagear a todos os professores das instituições pelas quais passei (Escola Estadual República Oriental do Uruguai, Colégio Estadual Cristo Rei, Colégio Estadual Conselheiro Zacarias, Colégio Estadual do Paraná e Universidade Federal do Paraná) e que contribuíram com a minha formação intelectual ao longo de 23 anos de estudo.

Muito obrigado aos amigos e mestres *Cláudia Luiza Recco* e *Paulo Celio Kuss Hammerschmidt* (*in memoriam*) por todo o incentivo e apoio que me deram com a escolha da Biologia.

Aos meus amados irmãos, *Rodrigo* e *Ricardo*, que mesmo à distância torceram pelo meu sucesso e, pacientemente, compreenderam minha ausência.

Aos meus amados pais, *Maria* e *Osiris*, pelo ‘kit de química’, pelo ‘primeiro microscópio’, por todo o sacrifício que fizeram por nós, mas, acima de tudo, pelo apoio incondicional, pelos exemplos de retidão e de perseverança, aos quais seguirei pelo resto de minha vida.

À minha amada *Waleska*, pela compreensão e encorajamento constantes durante tão longos e conturbados anos de doutorado e por ficar ao meu lado em todas as minhas escolhas.

Aos meus amados filhos, *Maria Vitória* e *Pedro Henrique*, que sempre, com muito cuidado e carinho, me ajudaram a transpor esse desafio.

*I have worked as hard and as well as I could,  
and no man can do more than this.*

*Charles Darwin.*



## RESUMO

Em um momento no qual a maioria dos *taxa* ainda precisa de descrição e a lista de extinções está aumentando, o número de taxonomistas está diminuindo. Por outro lado, análises filogenéticas e de delineamento de espécies com dados moleculares tem levado ao reconhecimento de um grande número de espécies crípticas, que requerem investigação morfológica. Suspeita-se que *Styela canopus* possa ser um complexo de espécies crípticas, pois apresenta ampla distribuição geográfica, grande variação morfológica e extensa sinonímia. Esta hipótese foi testada a partir do uso combinado de análises moleculares, de caracteres morfológicos qualitativos, métricos e merísticos. Sequências de COI e ANT foram utilizadas para recuperar as relações filogenéticas de 19 populações de *S. canopus*, bem como para acessar a variabilidade genética e estimar o fluxo gênico. Foram obtidas 268 sequências de COI e 67 sequências de ANT. Foi observada elevada diversidade genética nas populações de *S. canopus* (COI:  $\pi = 0,18$  e  $h = 0,99$ ; ANT:  $\pi = 0,13$  e  $h = 0,95$ ). Os métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança recuperaram as mesmas topologias, tanto para a análise de *locus* simples (COI) quanta para a análise *multilocus* (COI + ANT) e indicaram a existência de clados bem suportados. Foram utilizadas as metodologias de *locus* simples ABGD, bPTP e GMYC para investigar possíveis espécies. As três metodologias indicaram a existência de 12 espécies para os dados de *S. canopus*. O método BSD foi utilizado para investigar as espécies a partir dos dados concatenados e suportou sete das 12 espécies anteriormente obtidas. Em função destes resultados, propomos que a espécie passe a ser tratada como “complexo *Styela canopus*”. A análise filogeográfica indicou que as regiões do Panamá, Japão e costa leste dos Estados Unidos parecem estar isoladas das demais. Por outro lado, existe significativa conectividade entre as populações de Angola, Singapura, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Penha e Governador Celso Ramos, resultado de processos de bioinvasão. Embora a ANOVA tenha detectado diferenças significativas interpopulacionais entre as médias dos caracteres morfométricos, não foi possível discriminar claramente nenhuma das populações através da Análise de Componentes Principais. Os dados morfométricos não se mostraram muito eficazes para o estabelecimento de espécies dentro do complexo *Styela canopus* devido ao elevado grau de homoplasias. Em contrapartida, caracteres qualitativos como a cor da túnica na região próxima aos sifões, tamanho e morfologia dos folículos testiculares, número elevado de gônadas e morfologia das escamas sifonais demonstraram ser bons caracteres diagnósticos e permitiram a descrição de duas novas espécies para o gênero *Styela*. A morfoespécie A é descrita a partir de espécimes coletados em Bocas del Toro, costa atlântica do Panamá, e a morfoespécie B foi coletada no Espírito Santo, Brasil. O presente trabalho destaca a importância de uma abordagem combinada para o estudo da diversidade de ascídias e reforça a importância da taxonomia, tanto para a melhor compreensão da evolução da vida, quanto para a conservação da biodiversidade.

**Palavras-chave:** *Cox I*; Trocador ADT/ATP; Especiação incipiente; Morfometria; Variabilidade Fenotípica.

## ABSTRACT

In a time when most *taxa* need description and the list of extinctions is increasing, the number of taxonomists is declining. Paradoxically, phylogenetic and species delimitation analyzes with molecular data have raised the number of cryptic species, which require morphological investigation. It is suspected that *Styela canopus* may be a complex of cryptic species, because it has a wide geographic distribution, great morphological variation and extensive synonymy. This hypothesis was tested from the combined use of molecular and morphological analyzes. COI and ANT sequences were obtained and used to recover the phylogenetic relationships of 19 populations of *S. canopus*, as well as to access the genetic variability and estimate gene flow. Two hundred sixty eight sequences of COI and 67 sequences of ANT were obtained. High genetic diversity was observed in populations of *S. canopus* (COI:  $\pi = 0.18$  and  $h = 0.99$ ; ANT:  $\pi = 0.13$  and  $h = 0.95$ ). Bayesian Inference and Maximum Likelihood methods retrieve the same topologies for both, single *locus* analysis (COI) and *multilocus* analysis (COI + ANT), and indicate the existence of well-supported clades. The simple *locus* methodologies ABGD, bPTP and GMYC were used to delimit the species. The three methodologies indicated the existence of 12 species for *S. canopus* data. The BSD method was used to delimit the species from the concatenated data and supported seven of the 12 species previously obtained. Due to these results, we propose that the species be treated as "*Styela canopus* complex". The phylogeographic analysis indicated that the regions of Panama, Japan and the east coast of the United States are isolated from the others. On the other hand, there is a significant connectivity between Angola, Singapore, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Penha and Governador Celso Ramos populations, resulting from bioinvasion processes. Although ANOVA detected significant interpopulational differences between the means of the morphometric characters, it was not possible to discriminate clearly any of the populations through Principal Component Analysis. Morphometric data were not very effective for the establishment of species within the *Styela canopus* complex due to the high degree of homoplasy. On the other hand, qualitative characteristics such as the color of the tunic around the siphons, size and morphology of the testis follicles, high number of gonads and morphology of the siphonal scales showed diagnostic potential and allowed the description of two new species for the *Styela* genus. Morphospecies A is described from specimens collected in Bocas del Toro, Panama's Atlantic coast, and morphospecies B was collected in Espírito Santo, Brazil. The present work highlights the importance of a combined approach to the study of the diversity of ascidians and reinforces the value of the taxonomy, for a better understanding of life evolution and for the biodiversity conservation.

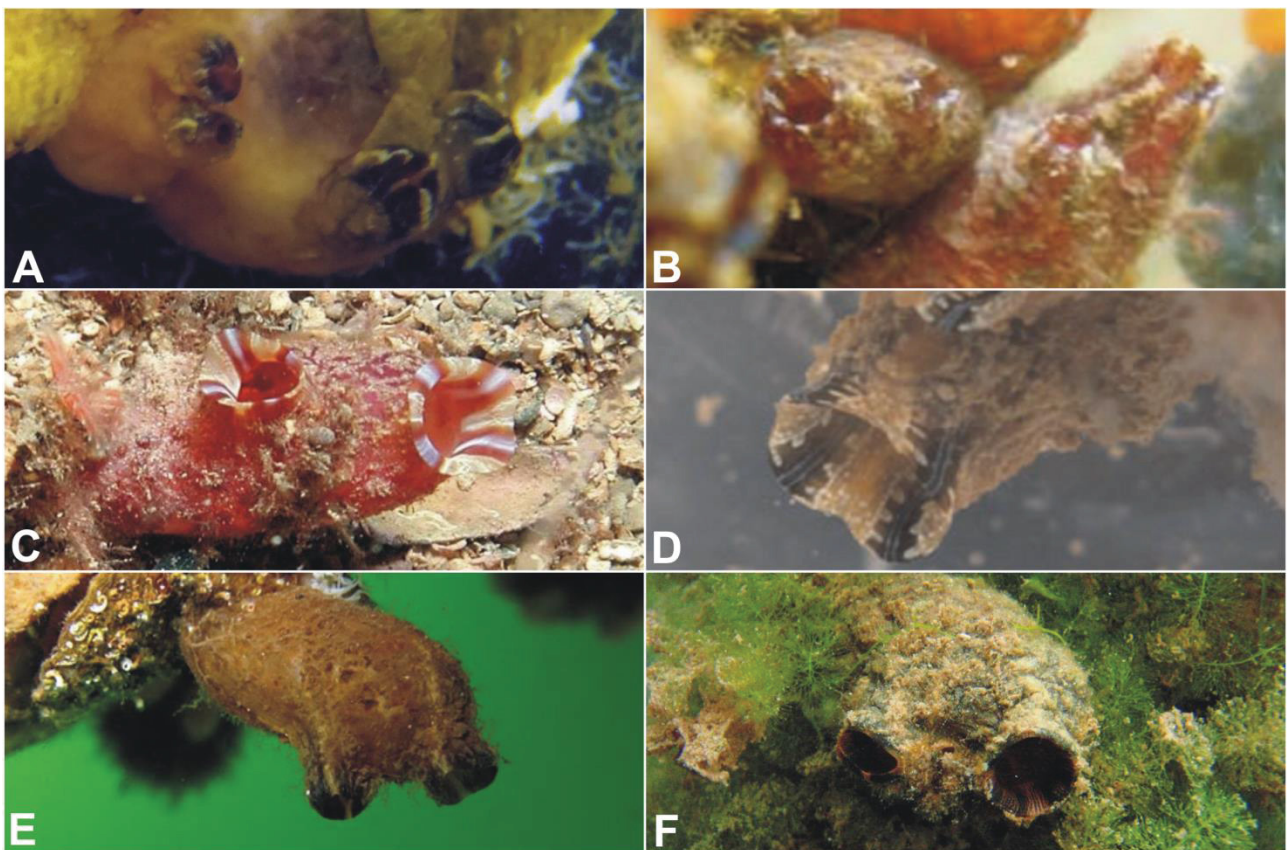
**Keywords:** *Cox I*. ADT/ATP translocase. Incipient speciation. Morphometry. Phenotypic variation.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	11
<b>CAPÍTULO I: Diversidade críptica em <i>Styela canopus</i> (Savigny, 1816): um nome, várias espécies</b> .....	14
<b>CAPÍTULO II: Elevada variabilidade morfológica em <i>Styela canopus</i> (Savigny, 1816): a dificuldade da taxonomia alfa em ascídias cosmopolitas</b> .....	40
<b>CAPÍTULO III: Duas novas espécies de <i>Styela</i> (Tunicata, Ascidiacea) registradas no Oceano Atlântico</b> .....	63
<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	72
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	73
<b>MATERIAL SUPLEMENTAR</b> .....	94

## INTRODUÇÃO GERAL

*Styela canopus* (Savigny, 1816) é uma espécie de ascídia solitária, com 20 mm de comprimento médio (MICHAELSEN, 1918a; TOKIOKA, 1951; KOTT, 1985), podendo atingir 40 mm (SAVIGNY, 1816). Apresenta elevada variação morfológica externa (ABBOTT *et al.*, 1997) sendo usualmente identificada pelo seu pequeno tamanho e formato oblongo, pela proximidade dos sifões localizados na região apical, pela presença de faixas brancas em ambos os sifões (Fig. 1) e, internamente, pela presença de um par de longos e sinuosos ovários de cada lado do corpo (SAVIGNY, 1816; HARTMEYER, 1926; VAN NAME, 1945; LAMBERT *et al.*, 2005).

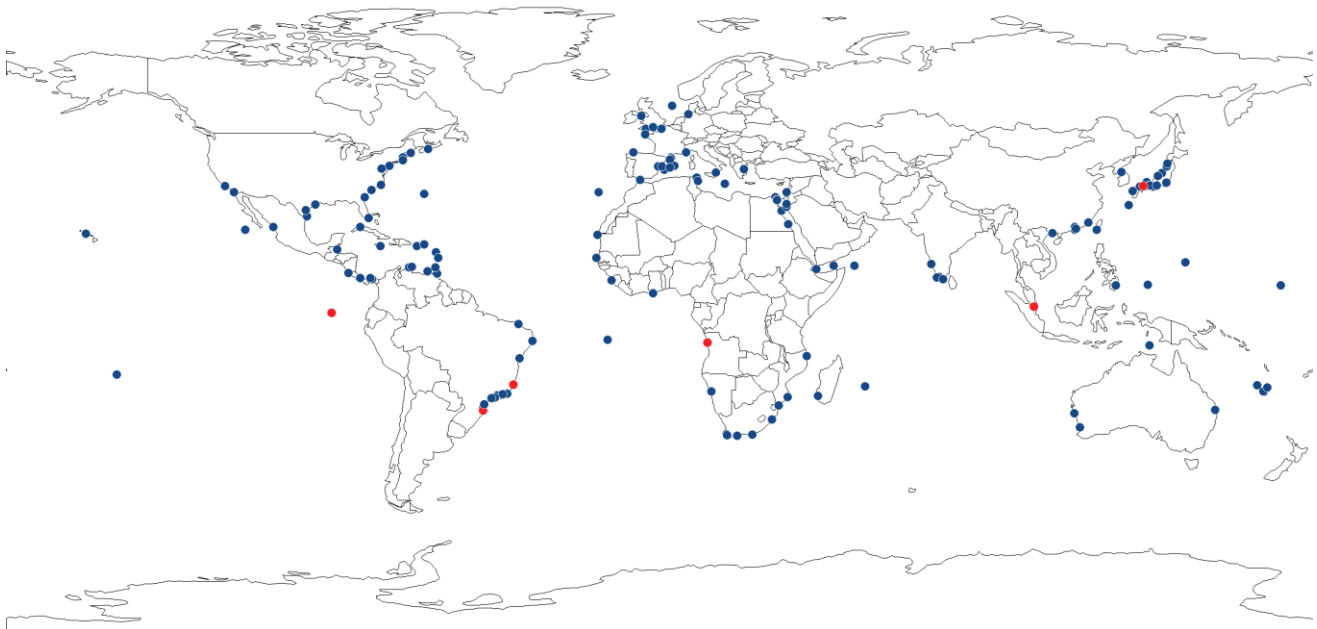


**Figura 1.** *Styela canopus* in situ. **A.** Brasil, Bahia (Foto: Rosana Rocha\*); **B.** Venezuela (Foto: ROCHA *et al.*, 2010); **C.** Holanda (Foto: Anne Frijsinger & Mat Vestjens\*\*); **D.** Singapura (Foto: LEE *et al.*, 2013); **E.** Panamá (Foto: Rosana Rocha\*\*); **F.** Panamá (Foto: Marc Rius\*\*). \* Acervo pessoal; \*\* Google Imagens.

Foi descrita inicialmente como *Cynthia canopus* (SAVIGNY, 1816, p. 154, pl. VIII, fig. 1) e, até meados do século 20, recebeu 21 denominações diferentes: *Cynthia canopus* Savigny, 1816; *Tethyum canopus* (Savigny, 1816); *Ascidia rugosa* Agassiz, 1850; *Cynthia partita* Stimpson, 1852; *Halocynthia partita* (Stimpson, 1852); *Styela partita* (Stimpson, 1852); *Tethyum partitum* (Stimpson, 1852); *Styela variabilis* Hancock, 1868; *Cynthia stellifera* Verrill, 1871; *Cynthia*

*canopoides* (Heller, 1877); *Styela canopoides* Heller, 1877; *Styela pupa* Heller, 1878; *Tethyum pupa* (Heller, 1878); *Styela bicolor* (Sluiter, 1887); *Styela bermudensis* Van Name, 1902; *Styela orbicularis* Sluiter, 1904; *Tethyum orbiculare* (Sluiter, 1904); *Styela marquesana* Michaelsen, 1918; *Styela stephensoni* Michaelsen, 1934; *Styela rectangularis* Kott, 1952 e *Styela barbaris* Kott, 1952.

Descrita originalmente no Mar Vermelho (SAVIGNY, 1816), já foi reportada para diversas regiões do mundo. É considerada uma espécie cosmopolita, sendo encontrada em águas quentes e subtropicais (Fig. 2, Supl. 1). É classificada como criptogênica, uma vez que sua distribuição geográfica nativa permanece incerta (ROCHA & KREMER, 2005), podendo ser originária do Indo-Pacífico (SIMKANIN *et al.*, 2016), especificamente da Ásia (ABBOTT *et al.*, 1997).



**Figura 2.** Distribuição mundial de *Styela canopus* inferida a partir dos registros históricos (maiores detalhes, ver Suplemento 1). Pontos vermelhos representam os novos registros trazidos no presente trabalho. Produzido com Diva-Gis 7.5 (HIJMANS *et al.*, 2004).

O registro no extremo setentrional foi realizado no Mar do Norte, em 1904, enquanto o registro no extremo meridional foi realizado na Baía de Still, África do Sul. Houve um registro de *S. canopus* para a região do Estreito de Magalhães, Chile (MICHAELSEN, 1898). Contudo, a reanálise do espécime depositado em museu demonstrou que a identificação fora equivocada (ROCHA, 2017; comunicação pessoal). No Brasil, seu primeiro registro foi na década de 1970, no Estado do Rio de Janeiro (MONNIOT, 1970), sendo considerada introduzida na costa brasileira (ROCHA & KREMER, 2005).

Trata-se de um animal incrustador que explora a superfície de substratos artificiais em portos, preferindo habitats perturbados (VAN NAME, 1945; ABBOTT *et al.*, 1997). Indivíduos da



espécie já foram registrados sobre o casco de navios em águas europeias (MILLAR, 1969) e aportados em Israel (GEWING & SHENKAR, 2017), aderidos a redes de pescas abandonadas (ROCHA & KREMER, 2005) e crescendo sobre as cordas de boias de sinalização (presente estudo), indicando o seu potencial para dispersão através da ação antrópica. Embora reportada com frequência em substratos artificiais, já foi verificada em ambiente natural na costa atlântica dos Estados Unidos (PLOUGH, 1978), crescendo sobre o mangue na Nova Caledônia (VASSEUR, 1967a), Jamaica (GOODBODY, 2003) e Venezuela (GUERRA-CASTRO *et al.*, 2011), sobre recifes em Belize (GOODBODY, 2000), sobre areia (SAVIGNY, 1816; VASSEUR, 1967a), em ambientes de grama marinha (WILLIAMS, 2007) e sobre as conchas de ostras (TOKIOKA, 1954b). Interessante observar sua capacidade de viver aderida à túnica de outras ascídias, tais como: *Phallusia nigra* Savigny, 1816 (SAVIGNY, 1816), *Microcosmus helleri* Herdman, 1881 e *Microcosmus exasperatus* Heller, 1878 (MICHAELSEN, 1918a), *Styela plicata* (Lesueur, 1823) (TOKIOKA, 1954b) e *Microcosmus* sp. (TOKIOKA, 1955). Ocorrem tanto como indivíduos isolados quanto em agregados (MONNIOT, 2002).

Sua ampla distribuição geográfica, a variação morfológica reportada e a extensa sinonímia indicam a possibilidade de que espécies crípticas estejam sendo reunidas sob a mesma denominação. Este problema tem sido recorrentemente identificado quando espécies com ampla distribuição são estudadas de maneira comparada e utilizando marcadores moleculares (RIUS & TESKE, 2013; FEHLAUER-ALE *et al.*, 2014; DOMINGOS *et al.* 2017). Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi testar a hipótese de que as populações reunidas sob a denominação “*Styela canopus*” constituem um complexo de espécies crípticas por meio de comparações morfológicas e investigando as relações genéticas entre populações.

# CAPÍTULO I

## Diversidade críptica em *Styela canopus* (Savigny, 1816): um nome, várias espécies.

### RESUMO

O uso rotineiro de técnicas de sequenciamento de DNA, de análises filogenéticas e de delineamento de espécies tem elevado o número de espécies crípticas descobertas, especialmente no ambiente marinho. Suspeita-se que *Styela canopus* possa ser, na realidade, um complexo de espécies crípticas uma vez que apresenta ampla distribuição geográfica e grande variação morfológica externa. Essa hipótese foi testada a partir de uma abordagem mitonuclear. Sequências de COI e ANT foram obtidas e utilizadas para recuperar as relações filogenéticas de 19 populações de *S. canopus*, bem como para acessar a variabilidade genética e estimar o fluxo gênico. Foram obtidas 268 sequências de COI e 67 sequências de ANT. Foi observada elevada diversidade genética nas populações de *S. canopus* (COI:  $\pi = 0,18$  e  $h = 0,99$ ; ANT:  $\pi = 0,13$  e  $h = 0,95$ ). Os métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança recuperaram as mesmas topologias, tanto para a análise de *locus* simples (COI) quanto para a análise *multilocus* (COI + ANT) e indicaram a existência de clados bem suportados. Foram utilizadas as metodologias de *locus* simples ABGD, bPTP e GMYC para delimitar possíveis espécies. As três metodologias indicaram a existência de 12 espécies para os dados de *S. canopus*. O método BSD foi utilizado para investigar as espécies a partir dos dados concatenados e suportou sete das 12 espécies anteriormente obtidas. Os dados indicaram que as regiões do Panamá, Japão e costa leste dos Estados Unidos estão isoladas das demais. Em contrapartida, existe significativa conectividade entre as populações de Angola, Singapura, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Penha e Governador Celso Ramos. Propomos que *S. canopus* passe a ser tratada como “complexo *Styela canopus*”. A existência de elevado número de espécies crípticas reforça a necessidade da taxonomia, tanto para a compreensão dos fenômenos evolutivos, quanto para a conservação da biodiversidade.

**Palavras-chave:** *Cox I*; Trocador ADT/ATP; Especiação incipiente.

### INTRODUÇÃO

Embora o termo espécie tenha sido utilizado pela primeira vez por Aristóteles é, a partir de Linneu, no clássico *Systema Naturae*, que espécie atinge o status de categoria taxonômica e passa a ser amplamente utilizado por biólogos em todo o mundo (MATEUS, 1989). Ainda que seja reconhecida como uma unidade taxonômica e que a maioria dos biólogos concorde que a espécie seja uma unidade natural (SITES & MARSHALL, 2004), ou seja, um fenômeno concreto da natureza e o principal conceito em biologia evolutiva (SIMPSON, 1951; MAYR, 1996), não há consenso do que exatamente seja uma espécie. A espécie pode ser entendida de diferentes formas, a depender do foco da análise. A discussão acerca do tema parece estar longe do fim, tendo o número de conceitos crescido a, pelo menos, vinte e quatro (HEY, 2001). O conceito mais amplamente aceito é o Conceito Biológico de Espécie, cujos princípios genéticos e evolutivos foram formulados pela primeira vez por Dobzhansky em 1937 (BORKIN *et al.*, 2004), para o qual espécies são grupos

intercruzantes de populações naturais que estão isoladas reprodutivamente umas das outras (MAYR, 1996). Complementarmente, as espécies podem ser consideradas como o produto da segregação da variabilidade genética total da natureza em “pacotes” separados por barreiras reprodutivas que previnem a formação de combinações não harmoniosas de genes incompatíveis, ou seja, cada espécie é um pool gênico harmonioso (MAYR, 1996). Dessa forma, espécies seriam entidades evolutivas reais que poderiam ser estudadas com abordagens genéticas modernas (DOBZHANSKY, 1951). Durante séculos, a descrição das espécies tem sido realizada de acordo com a morfologia dos animais. Todavia, apenas a morfologia pode não ser capaz de discriminar a fronteira entre duas espécies (CHOI, 2016) e pode conduzir a classificações ambíguas devido à elevada variabilidade fenotípica ou à existência de espécies crípticas (MAYDEM, 1997; AGAPOW *et al.*, 2004).

Nesse contexto, a expansão das técnicas moleculares, em especial o sequenciamento de DNA, tem contribuído para a delimitação de espécies e para a identificação de espécies crípticas (GOLDSTEIN & DESALLE, 2010; JÖRGER & SCHRÖDL, 2013). Espécies crípticas são duas ou mais espécies distintas classificadas equivocadamente como uma só (BICKFORD *et al.*, 2006). Não diferem morfologicamente entre si, ou diferem apenas ligeiramente e são, portanto, classificadas como uma só de acordo com a sistemática clássica, mesmo sendo geneticamente diferentes umas das outras em função do isolamento reprodutivo (MAYR, 1996). Portanto, para o reconhecimento de espécies crípticas é necessário acessar a diversidade genética distribuída dentro das espécies (BEHEREGARAY & CACCONE, 2007). Assim sendo, o uso de ferramentas moleculares para entender a biodiversidade do planeta tem levado a um número crescente de estudos que relatam a existência de espécies crípticas (BEHEREGARAY & CACCONE, 2007; PFENNINGER & SCHWENK, 2007). Elas têm sido encontradas desde os pólos até o equador e em todos os principais grupos taxonômicos terrestres e aquáticos (PFENNINGER & SCHWENK, 2007). A descoberta de espécies crípticas representa a oportunidade para a pesquisa de novos caracteres sob os quais a seleção natural atua, bem como para o estudo de caracteres não morfológicos que podem ser usados na diferenciação das espécies. Proporciona também o cenário para a investigação de novos mecanismos de especiação e para o planejamento da conservação da biodiversidade a partir de novos índices de diversidade taxonômica, tanto regional quanto global (BICKFORD *et al.*, 2006).

Entre as Ascídias (Chordata, Ascidiacea) são vários os exemplos nos quais o uso de marcadores moleculares resultou na identificação de espécies crípticas. *Pyura stolonifera* (Heller, 1878) foi reconhecida como um complexo de espécies que pôde ser separada, morfológica e geneticamente, em quatro espécies distintas (RIUS & TESKE, 2011, 2013). Entretanto, nem sempre os estudos genéticos são corroborados pela morfologia. Em *Diplosoma listerianum* (Milne-



Edwards, 1841), para a qual divergências genéticas superiores a 17% (fragmento de COI) dividiram a espécie em quatro linhagens evolutivamente distintas, não foram observadas diferenças morfológicas detectáveis (PÉREZ-PORTELA *et al.*, 2013). Da mesma forma, duas diferentes linhagens genéticas foram reconhecidas em *Clavelina lepadiformis* (Müller, 1776), isoladas em função de fatores ambientais (TARJUELO *et al.*, 2001). Reiterados estudos moleculares têm confirmado que a ascídia colonial *Botryllus schlosseri* (Pallas, 1766) também representa um complexo de espécies (LÓPEZ-LEGENTIL *et al.*, 2006; BOCK *et al.*, 2012; GRIGGIO *et al.*, 2014; NYDAM *et al.*, 2017). O uso de cinco marcadores nucleares revelou a existência de dois clados diferentes em *Ciona intestinalis* (Linnaeus, 1767) (NYDAM & HARRISON, 2010a), posteriormente confirmados por pequenas diferenças morfológicas em ovos, larvas e adultos (PENNATI *et al.*, 2015; BRUNETTI *et al.*, 2015).

A ascídia solitária *Styela canopus* é encontrada em águas subtropicais ao redor do mundo, especialmente em regiões portuárias e antropizadas (KOTT, 1985; LAMBERT, 2002). Devido a sua ampla distribuição geográfica e notável variação morfológica externa, questiona-se a validade do táxon como uma espécie única. Por esse motivo, o estudo foi desenhado para recuperar as relações filogenéticas de populações de *S. canopus* e testar a hipótese de que essa ascídia solitária representa um complexo de espécies crípticas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem




















Tendo em vista o panorama global de distribuição de *Styela canopus*, o delineamento amostral buscou incluir o maior número possível de populações/áreas geográficas. Foram obtidas amostras de 16 populações de *S. canopus* sendo três do Atlântico Norte, uma do Caribe, oito do Atlântico Tropical, uma do Pacífico Centro-Leste, duas do Pacífico Oeste-Norte e uma do Mediterrâneo. As coletas realizadas no Brasil foram feitas de acordo com as autorizações SISBIO nº 10011-1 e SISBIO nº 55157-1.

Às sequências obtidas a partir das amostras coletadas foram acrescentadas outras sequências obtidas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), provenientes de outras três populações, a saber: EUA, Maryland, Chesapeake Bay (KU905887); Índia, Thoothukundi, Golfo de Mannar (KX138501, KX138500, KX138498.1 e KT693195) e Espanha, Catalunha (KF309590). No total, 19 populações foram analisadas (Tab. 1).

Em campo, os espécimes foram removidos manualmente do substrato, anestesiados com a adição de mentol à água do mar e, após completo relaxamento, fixados em etanol 96%. Em laboratório, os espécimes foram seccionados longitudinalmente para a remoção de cerca de 20 mg

de tecido (gônadas e/ou parede do corpo), sendo o material restante estocado em etanol 96% a -20 °C (HILLIS *et al.*, 1996) e depositado na Coleção de Ascídias do Laboratório de Invertebrados Marinhos - Universidade Federal do Paraná.

**Tabela 1.** Populações amostradas de *Styela canopus*.

Oceano/Mar	ID	País	Localidade	Latitude	Longitude	Ano	N
Atlântico Norte	MA		Massachusetts	41°31'36"N	70°39'47"O	2014	5
	MR		Maryland	37°31'17"N	76°6'18"O	2014	1*
	GE		Geórgia	31°24'0"N	80°56'0"O	2014	12
Caribe	FL		Flórida	27°43'36"N	82°40'55"O	2017	8
	PA		Bocas Del Toro	9°20'26"N	82°14'26"O	2014	30
	CE		Ceará	3°42'36"S	38°28'24"O	2015	29
Atlântico Sul e Tropical	BA		Bahia	12°58'21"S	38°30'49"O	2014	36
	ES		Espírito Santo	20°19'7"S	40°17'56"O	2016	28
	RJ		Rio de Janeiro	22°56'49"S	43°9'50"O	2017	30
	SP		São Paulo	23°46'52"S	45°23'49"O	2017	30
	PE		Penha	26°47'16"S	48°36'24"O	2014	36
	GR		Gov. Celso Ramos	27°18'53"S	48°33'33"O	2016	30
Pacífico Centro-Leste	AN		Luanda	8°37'58 S	13°13'32"L	2013	36
	GA		Galápagos	0°27'0"S	90°16'0"O	2016	30
Pacífico Oeste-Norte	JP		Ilha de Sugashima	34°32'0"N	136°59'0"L	2015	31
Índico	SI		Singapura	1°17'14"N	103°8'47"L	2015	30
Mediterrâneo	IN		Thoothukundi	8°47'24"N	78°9'42"L	2014	4*
	ES		Catalunha	40°59'27"N	0°55'25"L	2013	1*
	IR		Haifa	32°49'12"N	35°0'16"L	2015	18

\* sequências obtidas no GenBank do NCBI.

### Marcadores Moleculares

Dois *loci* gênicos foram selecionados para uma abordagem mitonuclear. O gene mitocondrial de escolha foi o da subunidade I da Citocromo Oxidase (COI, *Cox I*), enquanto o gene nuclear foi o do transportador de nucleotídeos adenina (ANT) (Tab. 2).

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) usados para amplificar fragmentos específicos de DNA em espécimes de *Styela canopus*.

Locus	Primer	Sequência (5'-3')	pb	Referência
COI	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	710	Folmer <i>et al.</i> , 1994
	HC02198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA		
ANT	ANTf_Splic	TTGGCAGCTGATATTGGAAAAGG	300	Pineda <i>et al.</i> , 2011
	ANTr_Splic	CCAGACTGCATCATCATKCG		

As qualidades do mtDNA em estudos filogeográficos foram amplamente discutidas por Avise *et al.* (1987). Destacam-se o fato do mtDNA evoluir rapidamente em animais, resultando em alta variação da sequência de nucleotídeos, e de ser herdado uniparentalmente, permitindo que os

haplótipos sejam usados para estimar as histórias matrilineares de indivíduos e populações (AVISE, 2009). Além do mais, o mtDNA, em especial a COI, tem sido há tempos utilizado com sucesso em estudos filogenéticos (TURON & LÓPEZ-LEGENTIL, 2004; PÉREZ-PORTELA *et al.*, 2009), filogeográficos com identificação de espécies crípticas (TARJUELO *et al.*, 2001, 2004; RIUS & TESKE, 2013; GRIGGIO *et al.*, 2014; NYDAM *et al.*, 2017) e filogeográficos com enfoque em bioinvasão (TURON *et al.*, 2003; RIUS *et al.*, 2008; SHENKAR *et al.*, 2017) de ascídias.

O transportador de nucleotídeo adenina, também conhecido como trocador ATP/ADP, é um componente da membrana mitocondrial interna responsável pela troca do ATP da matriz mitocondrial com o ADP do lado extramitocondrial (SHERTZER & RACKER, 1976) sendo codificado pelo genoma nuclear (POWELL *et al.*, 1989; MIYA *et al.*, 1994). O número de cópias do gene ANT presentes no nDNA tende a ser baixo (JARMAN *et al.*, 2002), característica que o torna um marcador molecular confiável, uma vez que genes parálogos (ou seja, relacionados por duplicação), *a priori*, devem ser evitados em análises filogenéticas (HELLMUTH *et al.*, 2015). No genoma da ascídia *Halocynthia roretzi* (Drasch, 1884) são encontradas uma, no máximo duas cópias do gene ANT (MIYA *et al.*, 1994). Apresenta também as vantagens de não precisar ser clonado antes do sequenciamento e de ter provado ser útil para identificar a diversidade de espécies e padrões filogeográficos de invertebrados marinhos (TESKE *et al.*, 2014), incluindo ascídias (PINEDA *et al.*, 2011; RIUS & TESKE 2013; SHEETS *et al.*, 2016).

### **Extração de DNA, PCR e Sequenciamento**

O DNA genômico das amostras foi extraído de acordo com o método utilizado no PureLink® Genomic DNA Kit (Invitrogen). Concentrações e índices de pureza do DNA foram determinados através de espectrofotometria (NanoDrop 2000 - Thermo Scientific®).

As reações de PCR consistiram de 10-50 ng de DNA extraído, 2,5 µl de tampão 10X, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de dNTP (Biotools BeM Labs), 10 pmol de cada primer, 1 U de Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen) e 1 µl de BSA (albumina bovina) em 25 µl de volume de reação. A adição do BSA minimiza a ação de agentes inibidores da PCR (BOEGER *et al.*, 2007). As reações foram realizadas em termociclador (Eppendorf) de acordo com os seguintes parâmetros:

a) COI - 95° C por 5 minutos, 35 ciclos de: 94° C por 40 segundos, 43° C por 30 segundos, 72° C por 45 segundos, seguidos por uma extensão final de 3 minutos a 72° C;

b) ANT - 94° C por 2 minutos, 35 ciclos de: 94° C por 1 minuto, 58° C por 30 segundos, 72° C por 30 segundos, seguidos por uma extensão final de 6 minutos a 72° C.

Os produtos de PCR foram purificados através dos métodos PEG 8000 (polietilenoglicol) ou ExoSap (enzimático). O sequenciamento de DNA foi realizado pelo método Sanger em sequenciador ABI 3500xL (Life Technologies). Foram sequenciadas ambas as cadeias do DNA

(leve e pesada). As sequências foram checadas visualmente e corrigidas, quando necessário, através de criteriosa análise dos cromatogramas com o auxílio do editor de sequências BioEdit 7.2.6 (HALL, 1999). As sequências obtidas nesse estudo foram depositadas no BOLD Systems (RATNASINGHAM & HEBERT, 2007) sob os números de acesso: COI, SCAN001-17 a SCAN262-17; ANT, SCANT001-18 a SCANT067-18.

### **Análise das Sequências**

O alinhamento das sequências foi realizado com Mafft v.7 (KATO, 2002; KATO & STANDLEY, 2013) através da plataforma online (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (KATO *et al.*, 2017). Esse método tem sido considerado de maior acurácia quando comparado aos demais métodos de alinhamento de múltiplas sequências (NUIN *et al.*, 2006, GOLUBCHIK *et al.*, 2007).

A saturação por substituição para cada posição do códon foi testada em ambos os genes através do método baseado em entropia (XIA *et al.*, 2003), executado no programa DAMBE (XIA, 2009; XIA, 2013), em especial para COI onde a 3ª posição do códon evolui extremamente rápido em mtDNA de vertebrados (XIA *et al.*, 1996). Para verificar a presença de códons de parada, as sequências de COI foram traduzidas em sequências de aminoácidos através do programa DNASP v. 5.1 (LIBRADO & ROZAS, 2009), usando o código genético para mtDNA de ascídias (YOKOBORI *et al.*, 1993; KONDOW *et al.*, 1999).

A inferência de fase e a reconstrução dos haplótipos do gene ANT foi realizada aplicando o método bayesiano do PHASE v. 2.1 (STEPHENS *et al.*, 2001; STEPHENS & DONNELLY, 2003), executado no programa DNASP 5.1 (LIBRADO & ROZAS, 2009), pois esse método apresenta baixíssima taxa de falso-positivos (GARRICK *et al.*, 2010). O programa RDP v. 4.95 Beta (MARTIN & RYBICKI, 2000; MARTIN *et al.*, 2015) foi utilizado para detectar possíveis recombinações entre as sequências de ANT.

O teste estatístico *Tajima D* (TAJIMA, 1989) foi aplicado aos dados totais de cada *locus* para testar a existência de pressão seletiva agindo sobre as substituições (KORNELIUSSEN *et al.*, 2013). O teste *Tajima D* foi realizado com auxílio do programa DNASP v. 5.1 (LIBRADO & ROZAS, 2009).

### **Filogenia**

Os modelos evolutivos de substituição nucleotídica para cada *locus* foram estimados através do JModelTest v.2.1.6 (DARRIBA *et al.*, 2012), aplicando AIC como critério de seleção (AKAIKE, 1974). Para a reconstrução das relações filogenéticas entre os haplótipos, foram utilizadas Inferência Bayesiana (IB) e Máxima Verossimilhança (MV) para cada conjunto de dados, mitocondrial e mitonuclear. As filogenias obtidas segundo Máxima Verossimilhança foram

inferidas com RAxML HPC2 on XSEDE v. 8.2.10 (STAMATAKIS, 2014), usando GTRGAMMA como modelo evolutivo e 1000 replicações de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985). As análises de modelo evolutivo e Máxima Verossimilhança foram executadas no portal CIPRES Science Gateway (<https://www.phylo.org/>) (MILLER *et al.*, 2010). Foi utilizado o programa MrBayes 3.2.6 (RONQUIST *et al.*, 2012) para inferir a filogenia segundo Inferência Bayesiana, através de  $3 \times 10^5$  gerações (desvio padrão  $< 0,05$ ) para COI e  $5 \times 10^5$  gerações (desvio padrão  $< 0,05$ ) para a matriz concatenada (COI + ANT).

Para a reconstrução das filogenias foram adicionados os haplótipos de duas espécies congêneres, *Styela plicata* (Lesueur, 1823) e *Styela clava* Herdman, 1881, disponíveis no *GenBank* (Supl. 3). Tal procedimento teve como objetivo verificar as relações evolutivas dos haplótipos de *S. canopus* com as espécies congêneres diante de um cenário de especiação incipiente. Três espécies de Styelidae foram utilizadas como grupo externo: *Microcosmus squamiger* Michaelson, 1927 e *Botryllus schlosseri* para a abordagem mitocondrial e *Botrylloides nigrum* Herdman, 1886 para a abordagem mitonuclear. As sequências utilizadas como grupo externo foram obtidas através do consenso de maioria para os seguintes *taxa*: *M. squamiger* (n = 283), *B. schlosseri* (n = 512) e *B. nigrum* (n = 13) (Supl. 2). Os ramos foram interpretados como ‘confiáveis’ quando os valores de *bootstrap* foram iguais ou acima de 70% (LEMEY *et al.*, 2009) e de probabilidade posterior iguais ou acima de 0,95 (HUELSENBECK & RANNALA, 2004).

Adicionalmente, as relações entre os haplótipos de COI foram investigadas através da parcimônia estatística descrita por Templeton *et al.* (1992) que permite estimar uma árvore não enraizada, fornecendo uma relação plausível entre os haplótipos. A análise estatística divide os dados em redes independentes de haplótipos conectadas por mudanças não homoplásticas com 95% de probabilidade (TEMPLETON *et al.*, 1992). A rede de haplótipos é um método interessante para investigar as relações entre os haplótipos, pois não requer um número razoavelmente grande de caracteres variáveis para reconstruir com confiabilidade essas relações (CLEMENT *et al.*, 2000). Essa rede foi obtida segundo o método TCS, executado através do programa POPART 4.8.4 (CLEMENT *et al.*, 2002).

### **Delimitação das Espécies**

A delimitação de espécies, ou seja, a identificação de diversidade biológica ao nível específico deve ser realizada a partir de métodos diferentes para verificar se os grupos delimitados são consistentemente recuperados sob diferentes parâmetros de análise (CARSTENS *et al.*, 2013). Por esse motivo foram utilizadas três diferentes abordagens de *locus* simples (COI) e uma de *multilocus* (COI + ANT) para investigar as possíveis espécies crípticas em *S. canopus*.



- a) *ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery)*. Essa abordagem agrupa as possíveis espécies de acordo com o *barcode gap*, que representa a lacuna observada na distribuição das distâncias genéticas intra e interespecíficas (PUILLANDRE *et al.*, 2012). O método usa uma série de divergências intraespecíficas para inferir, a partir dos dados, um limite de confiança unilateral. O método então detecta o primeiro *barcode gap* significativo além desse limite e o utiliza para particionar os dados. A inferência do limite e da detecção de intervalo é aplicada recursivamente aos grupos obtidos anteriormente para obter partições mais finas até que não haja mais particionamento. As sequências de COI alinhadas foram carregadas na plataforma ABGD (<http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html/>), sendo a análise rodada utilizando a distância simples e os demais parâmetros *default*.
- b) *bPTP (Poisson Tree Processes)*. Essa abordagem modela a taxa de especiação diretamente do número de substituições, a partir do pressuposto de que o número de substituições entre espécies é significativamente maior do que o número de substituições dentro das espécies (ZHANG *et al.*, 2013). A árvore obtida a partir da análise de Máxima Verossimilhança da COI foi utilizada como entrada no servidor bPTP (<http://species.h-its.org/>), utilizando as configurações *default*.
- c) *GMYC (Generalized Mixed Yule Coalescent)*. Esse procedimento utiliza a máxima verossimilhança para delimitar espécies com base em árvores ultramétricas. O método estima o ponto de transição em uma árvore, antes do qual todos os nós refletem eventos de diversificação de espécies e após o qual todos os nós representam um processo coalescente populacional (PONS *et al.*, 2006). Dez mil árvores ultramétricas do gene mitocondrial foram recuperadas por Inferência Bayesiana. A análise foi procedida com auxílio do programa BEAST v. 2.4.7 (BOUCKAERT *et al.*, 2014), através de  $10 \times 10^7$  gerações, assumindo a existência de um relógio molecular e uma taxa mutacional de  $\mu = 0,02/\text{M.a./locus}$  (BROWN *et al.*, 1979). Foi utilizado o mesmo modelo de substituição nucleotídica utilizado nas análises filogenéticas. A árvore consenso resultante foi submetida à análise GMYC através da plataforma online (<http://species.h-its.org/gmyc/>), sob o modelo de limite único. Esse modelo apresenta melhores resultados do que o modelo de vários limiares (FUJISAWA & BARRACLOUGH, 2013).
- Clados formados por duas ou menos sequências não foram considerados na determinação do consenso a partir da comparação dos resultados obtidos por ABGD, bPTP e GMYC.
- d) *BSD (Bayesian Species Delimitation)*. Esse método calcula a probabilidade posterior de espécies potenciais após definir as possíveis espécies em uma dada filogenia (RANNALA & YANG, 2003; YANG & RANNALA, 2010). As sequências de COI e ANT foram previamente concatenadas com o auxílio do programa Mesquite v. 3.31 (MADDISON &

MADDISON, 2017). A análise foi realizada utilizando o programa BPP (YANG, 2015) para inferir o *theta* ancestral (tamanho da população ancestral), os tempos de divergência, as delimitações de espécies e a árvore das espécies. Foi utilizado o algoritmo 0 (zero) de delimitação de espécies. Esse método acomoda a filogenia das espécies, bem como a classificação incompleta da linhagem em função do polimorfismo ancestral. A modelagem utilizou um G (2, 1000), com média  $2/2000 = 0,001$ . A análise foi executada duas, com diferentes números aleatórios de árvores iniciais, para confirmar a consistência entre corridas (RANNALA & YANG, 2013).

### Genética de Populações

As sequências de COI e ANT foram utilizadas para calcular as diversidades haplotípica e nucleotídica intrapopulacionais, através do programa DNASP 5.1 (LIBRADO & ROZAS, 2009). Para inferir o fluxo gênico, as sequências de COI foram utilizadas para estimar os valores pareados de *Fst* com o auxílio do programa ARLEQUIN v. 3.5.2 (EXCOFFIER *et al.*, 2005) usando o método de distância de Tamura-Nei (TAMURA & NEI, 1993).

Para testar a hipótese de distribuição não aleatória dos haplótipos entre as diferentes localidades geográficas foi executado o teste exato para diferenciação de populações (RAYMOND & ROUSSET, 1995). A correlação entre distâncias geográficas e distâncias genéticas foi investigada com o auxílio da ferramenta disponível na plataforma BOLD Systems (RATNASINGHAM & HEBERT, 2007) e, assim, testar o isolamento pela distância entre as populações (ROUSSET, 1997). A ferramenta utiliza dois métodos para investigar a correlação entre distâncias: a comparação entre a *Minimum Spanning Tree* dos locais de coleta e a divergência máxima intraespecífica (BLAGOEV *et al.*, 2016) e o Teste de Mantel (MANTEL, 1967), que compara a matriz de distância geográfica (em quilômetros) e a matriz de divergência genética. A ferramenta foi executada usando o método de distância pareada e Muscle (EDGAR, 2004) como opção de alinhamento.

Por fim, as sequências de COI foram submetidas a análise de caráter diagnóstico, executada na plataforma BOLD Systems (RATNASINGHAM & HEBERT, 2007). Esse procedimento fornece uma forma de examinar o polimorfismo de nucleotídeos ou aminoácidos entre conjuntos de sequências agrupadas por rótulos taxonômicos ou geográficos. A ferramenta identifica as bases de consenso de cada grupo, compara-as com as demais sequências em outros grupos e caracteriza como cada base de consenso é única. Dessa forma, categoriza as bases de consenso pelo seu potencial diagnóstico (MEGAN *et al.*, 2013).

## RESULTADOS

### Sequências

Foram obtidas 268 sequências de COI, que resultaram em 141 haplótipos, considerando haplótipo um conjunto de sequências que compartilham a mesma composição de nucleotídeos (TEMPLETON, 2001). O comprimento final, após alinhamento e cortes das extremidades, foi de 516 pares de bases livres de *gaps*. Duzentos e sessenta e cinco sítios polimórficos (51,3%) foram verificados. A presença de pseudogenes foi afastada pela ausência de códons de parada nas sequências analisadas (BENSASSON *et al.*, 2001).

Foram obtidas 67 sequências de ANT, resultantes em 44 haplótipos. O comprimento final, após alinhamento e cortes das extremidades, foi de 220 pares de bases livres de *gaps*, dos quais 87 foram polimórficos (39,5%). Nenhuma recombinação foi detectada para as sequências de ANT. É sabido que o fragmento de ANT usado pode conter *introns* em algumas espécies de metazoários. Todavia, todas as sequências de ANT obtidas puderam ser traduzidas em sequências de aminoácidos indicando, assim, a ausência de regiões intrônicas (JARMAN *et al.*, 2002).

Não foi verificada evidência de saturação para ambos os genes, uma vez que o Iss (índice de saturação por substituição) foi significativamente menor do que o Iss.c (índice crítico de saturação por substituição) tanto para as posições 1 e 2 quanto para a 3ª posição do códon (Tab. 3). Os valores do teste *Tajima D* foram positivos e não significativos, tanto para COI (*Tajima D* = 0,87270,  $p > 0,10$ ) quanto para ANT (*Tajima D* = 0,52754,  $p > 0,10$ ), indicando que ambos os *loci* são seletivamente neutros. Por esse motivo, o polimorfismo verificado seria mais bem explicado em função da deriva genética aleatória (KIMURA, 1981). Dado o número de sítios polimórficos, verificamos que o *locus* COI é mais informativo que o *locus* ANT.

**Tabela 3.** Resultados dos testes de saturação por substituição.

Pos. Códon	COI						ANT					
	Top. Simétrica			Top. Assimétrica			Top. Simétrica			Top. Assimétrica		
	Iss	Iss.c	p	Iss	Iss.c	p	Iss	Iss.c	p	Iss	Iss.c	p
1 e 2	0,090	0,784	0,000	0,087	0,756	0,000	0,044	0,782	0,000	0,045	0,792	0,000
3	0,625	0,778	0,000	0,591	0,777	0,000	0,440	0,845	0,000	0,425	0,926	0,000

### Filogenia e Delimitação de Espécies

O modelo GTR+ $\gamma$ +I foi o modelo de substituição nucleotídica indicado para ambos os *loci* e utilizado na recuperação das filogenias. Usando ambos os procedimentos, Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança, quase todos os haplótipos de COI foram reunidos em 12 grupos com três ou mais sequências (G1-G12), com exceção de três que foram desconsiderados nas análises (Fig. 1).





O Grupo 3, formado pelos haplótipos oriundos dos Estados de Massachusetts, Maryland, Geórgia e Flórida (costa leste dos Estados Unidos), foi totalmente suportado (IB = 1; MV = 100) sendo relacionado como grupo irmão do Grupo 4. O Grupo 4, também totalmente suportado (IB = 1; MV = 100), é formado por haplótipos exclusivos do Panamá. No entanto, a relação evolutiva entre G3 e G4 permanece incerta diante da ausência de suporte.

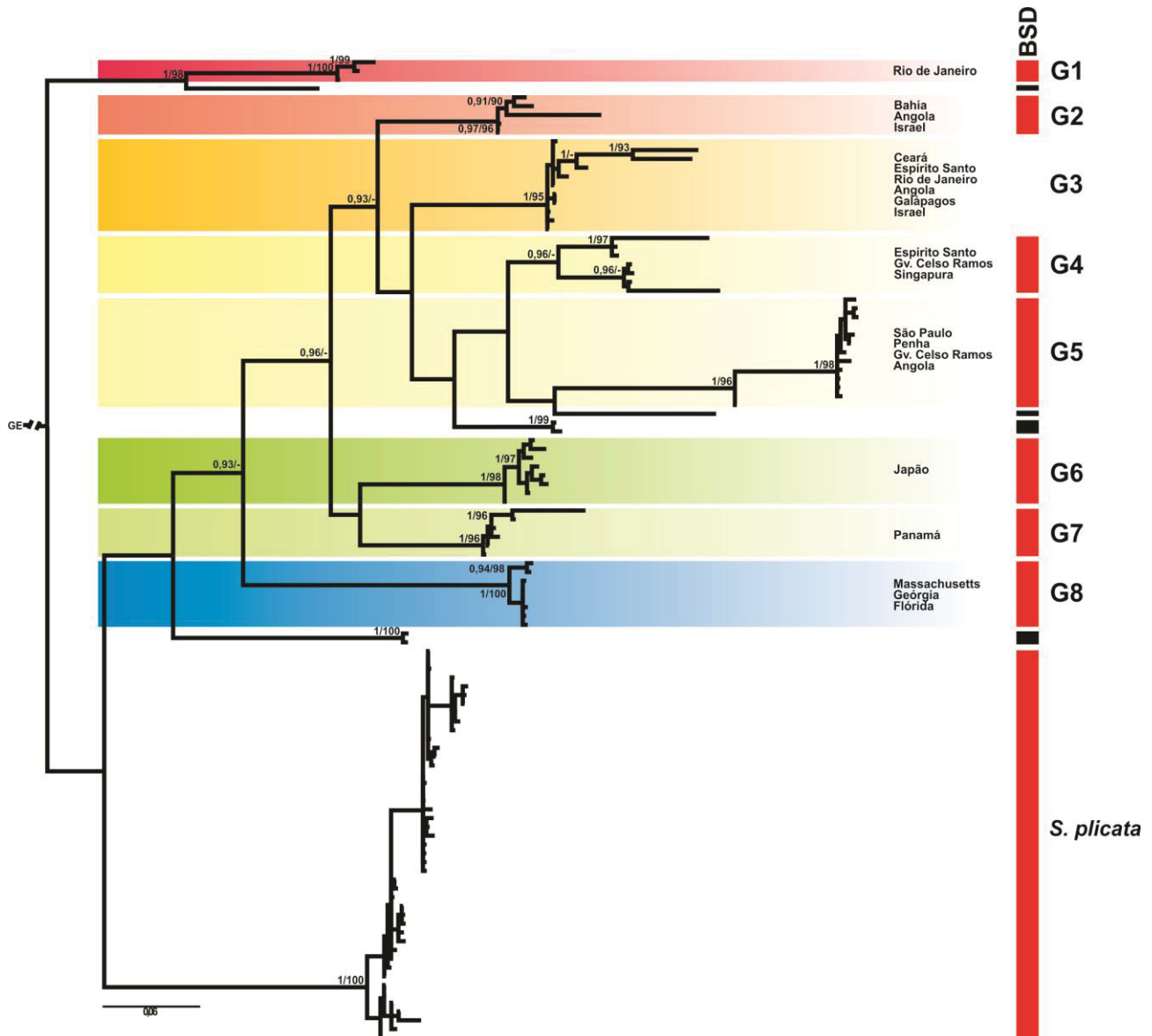
A monofilia do Grupo 5, formado por haplótipos amostrados em Israel, foi fortemente suportada (IB = 1; MV = 99). Da mesma forma, o Grupo 6 (IB = 1; MV = 97) e o Grupo 7 (IB = 1; MV = 92) foram bem suportados por ambas as análises. O Grupo 6 é formado por haplótipos procedentes dos Estados do Espírito Santo, São Paulo e Santa Catarina (Governador Celso Ramos e Penha), bem como de Singapura. O Grupo 7 é constituído por haplótipos amostrados nos Estados do Ceará, Espírito Santo, São Paulo e Santa Catarina. As análises de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança indicaram que G6 e G7 seriam clados irmãos (IB = 1; MV = 89).

Os Grupos 8, 9 e 10 foram totalmente suportados por ambas as análises (IB = 1; MV = 100). O Grupo 8 é formado por haplótipos dos Estados de São Paulo e Santa Catarina e também por haplótipos provenientes de Angola (costa oeste da África). O haplótipos registrados na Índia e na Espanha formaram, juntamente com haplótipos oriundos de Angola, o Grupo 9. Por sua vez, o Grupo 10 é o clado formado por haplótipos provenientes do maior número de regiões amostradas, sendo procedentes dos Estados do Ceará, Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro, além de Angola, Galápagos, Singapura e Israel.

Por fim, temos o Grupo 11, formado por haplótipos apenas do Estado da Bahia (IB = 1; MV = 99) e o Grupo 12, formado por haplótipos do Estado da Bahia, de Angola e Israel, suportado tanto pela Inferência Bayesiana (IB = 1) quanto pela Máxima Verossimilhança (MV = 85). A relação de irmandade entre G11 e G12 foi bem suportada em ambas as análises (IB = 1; MV = 99).

Todos os agrupamentos descritos foram identificados como espécies em potencial pelos três métodos de delimitação empregados. Pelo método de *gap barcoding* (ABGD) foram obtidos 22 grupos para valores de  $P$  (*Prior Maximal Distances*) compreendidos entre 0,0010 e 0,0046, enquanto que para  $P \geq 0,0077$  foram obtidos 18 grupos. Embora não haja consenso em como interpretar resultados discordantes na análise ABGD (KEKKONEN & HEBERT, 2014), foi considerado mais confiável o resultado com 18 grupos e  $P = 0,0359$ , uma vez que os valores iniciais e recursivos de  $P$  foram estáveis a partir desse ponto (RAZKIN *et al.*, 2017). Foram verificadas 19 potenciais espécies pelo método bPTP. O valor de máxima verossimilhança obtida pela análise GMYC (1841,22) foi significativamente maior do que no modelo nulo (1764,38) (*razão de verossimilhança* = 153,67, *LR teste* = 0,0) e resultou em 19 possíveis espécies. A diferença verificada no número de espécies indicadas pelos métodos de delimitação ocorreu em função da divisão de *S. plicata* que não é objeto de estudo no presente trabalho.

A existência de espécies crípticas também foi indicada pela abordagem mitonuclear. A análise filogenética dos dados concatenados recuperou oito clados (G1 a G8), bem suportados pela Inferência Bayesiana e pela Máxima Verossimilhança, desconsiderando aqueles formados por uma ou duas sequências (Fig. 2).



**Figura 2.** Resultados de delimitação de espécies para *multilocus* pelo método BSD. Filogenia inferida por análise de Inferência Bayesiana da matriz concatenada de COI e ANT. Caixas pretas representam grupos não considerados. Números em nós correspondem aos valores de probabilidade posterior ( $> 0,9$ ) e de *bootstrap* ( $> 70\%$ ), respectivamente.

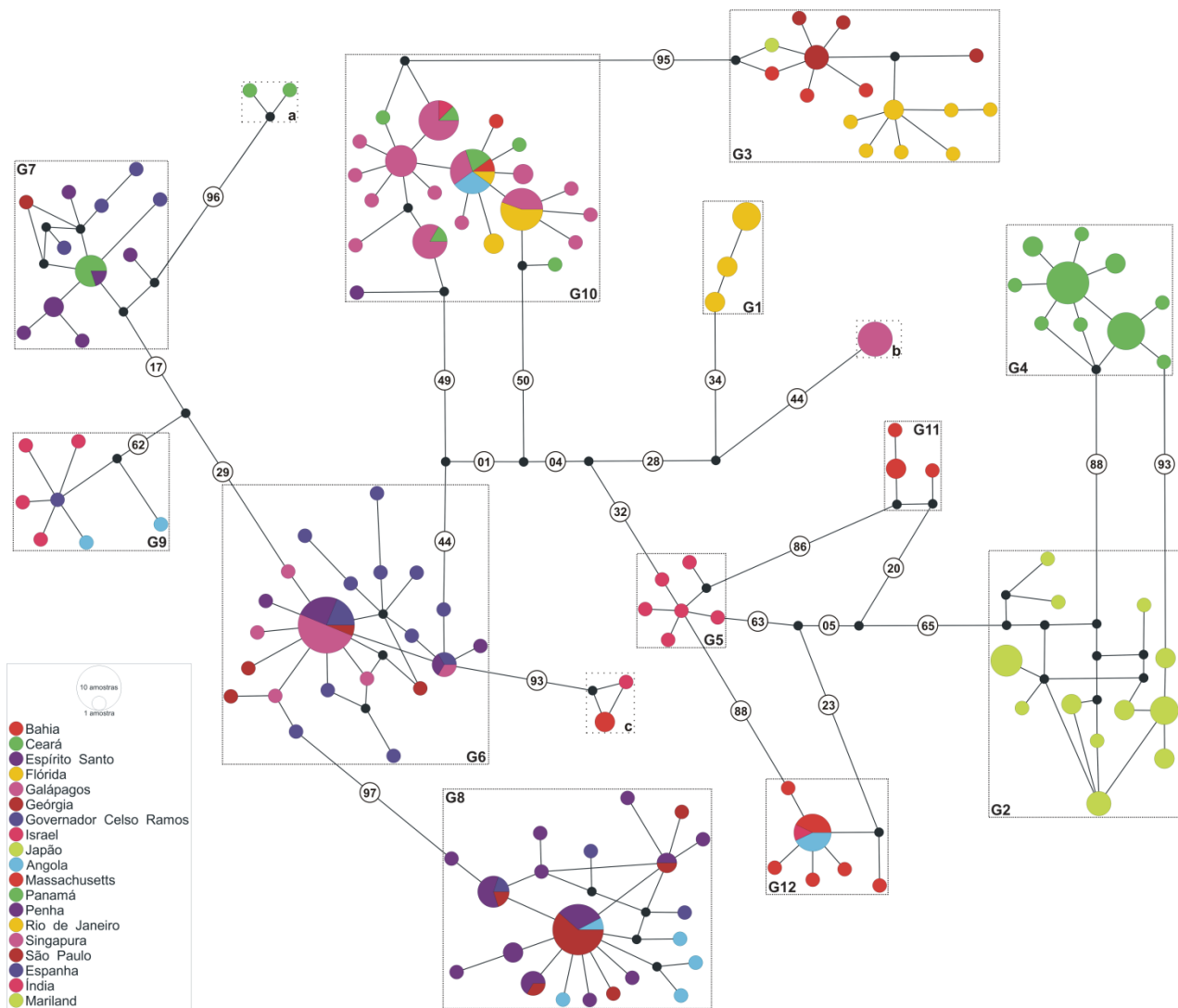
O Grupo 1, formado por haplótipos do Estado do Rio de Janeiro, foi totalmente suportado por ambos os métodos (IB = 1; MV = 100). A monofilia do Grupo 2 foi bem suportada (IB = 0,97; MV = 96) e agrupou haplótipos amostrados no Estado da Bahia, em Angola e em Israel. Haplótipos oriundos dos Estados do Ceará, Espírito Santo e Rio de Janeiro, além de Angola, Galápagos e Israel formaram o Grupo 3. Esse grupo foi bem suportado por ambas as análises (IB = 1; MV = 95).

O Grupo 4, suportado apenas pela de Inferência Bayesiana (IB = 0,96), agrupa haplótipos dos Estados do Espírito Santo e Santa Catarina, bem como de Singapura. O clado G6 (IB = 1; MV = 98) reuniu todos os haplótipos do Japão. Da mesma forma, o Grupo 7 (IB = 1; MV = 96) reuniu todos os haplótipos provindos do Panamá. Por fim, o Grupo 8 reuniu os haplótipos dos Estados de Massachusetts, Geórgia e Flórida, sendo totalmente suportado por ambas as análises (IB = 1; MV = 100).

Os oito grupos recuperados pela análise *multilocus* foram equivalentes a oito grupos recuperados pelas análises de *locus* simples,  $G1 \cong G1$ ,  $G2 \cong G9$ ,  $G3 \cong G10$ ,  $G4 \cong G6$ ,  $G5 \cong G8$ ,  $G6 \cong G2$ ,  $G7 \cong G4$  e  $G8 \cong G3$ , respectivamente. A análise BSD indicou a existência de 76 possíveis espécies. Todavia, apenas 11 tiveram valores de probabilidade posterior superiores a 0,75. Foram consideradas confiáveis aquelas espécies cujos valores de probabilidade posterior estavam acima de 0,9 (G1,G2,G4-G8, Fig. 2).

A análise pelo método TCS revelou uma intrincada rede de haplótipos, com 15 grupos divergentes (G1-G12; a, b, c) separados por inúmeras substituições nucleotídicas e, na maioria dos casos, por haplótipos intermediários (Fig. 3). Os grupos G1 a G12 correspondem exatamente aos grupos G1-G12 reconhecidos na filogenia de COI, enquanto os grupos *a*, *b* e *c* correspondem aos clados ignorados com duas ou menos sequências (Fig. 1). Assim sendo, de forma semelhante às análises anteriores, a rede de haplótipos sustenta a existência de diversas linhagens evolutivas independentes em *S. canopus*, bem como o isolamento do Panamá, Japão e da região norte americana compreendida entre Massachusetts e Flórida.

Além disto, os haplótipos mais frequentes são, geralmente, aqueles que ocorrem em várias localidades. Esses haplótipos compartilhados parecem centralizar padrões de constelação dentro dos grupos G6, G7, G8, G10 e G12, isto é, seriam os haplótipos mais antigos dos quais outros haplótipos derivaram. Algumas localidades têm haplótipos bastante espalhados nos grupos (linhagens) e todos são ou compartilhados ou derivados, ou seja, receberam haplótipos de várias linhagens distintas e, por isto, apresentam elevada diversidade nucleotídica (*e.g.* Ceará, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Angola, Singapura e Israel).



**Figura 3.** Rede de haplótipos obtida por TCS a partir das 268 sequências de COI. São indicadas apenas as substituições que separam os grupos (esferas com números). A frequência de cada haplótipo é indicada pelo diâmetro da esfera. Pontos negros representam haplótipos intermediários.

Legenda: G1: Rio de Janeiro; G2: Japão; G3: Massachusetts, Maryland, Geórgia e Flórida; G4: Panamá; G5: Israel; G6: Espírito Santo, São Paulo, Penha, Governador Celso Ramos e Singapura; G7: Ceará, Espírito Santo, São Paulo e Governador Celso Ramos; G8: São Paulo, Penha, Governador Celso Ramos e Angola; G9: Angola, Índia e Espanha; G10: Ceará, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Angola, Galápagos, Singapura e Israel; G11: Bahia; G12: Bahia, Angola e Israel; a: Ceará; b: Singapura; c: Bahia e Israel.

### Genética de populações

Estimativas da diversidade genética representam um importante recurso para a avaliação da biodiversidade animal, sendo as mais utilizadas a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e a diversidade haplotípica ( $h$ ), obtidas a partir de sequências de COI (GOODALL-COPESTAKE *et al.*, 2012). Houve grande variação nos valores de  $\pi$  e  $h$  intrapopulacionais de *S. canopus*, tanto para COI quanto para ANT (Tab. 4). A variação de  $h$  foi maior para o locus ANT (*Média* = 1,0; *DP* =  $\pm 0,3451$ ) do que para o locus COI (*Média* = 0,9230; *DP* =  $\pm 0,0699$ ). As populações de Angola, Singapura, Bahia, Ceará, Epírito Santo, Rio de Janeiro e Governador Celso Ramos apresentaram os

maiores valores de  $\pi$  para ambos os *loci*. São Paulo, Penha e Israel apresentaram valores de  $\pi$  maiores para COI do que para ANT, enquanto Panamá, Galápagos e Japão maiores valores de  $\pi$  para ANT do que para COI. Massachusetts, Maryland, Geórgia e Flórida apresentaram baixos valores de  $\pi$  em ambos os *loci*.

**Tabela 4.** Diversidades nucleotídica ( $\pi$ ) e haplotípica ( $h$ ) intrapopulacionais e para os dados totais em cada *locus*.

População	COI				ANT			
	$\pi$	$h$	<i>sq</i>	<i>hp</i>	$\pi$	$h$	<i>sq</i>	<i>hp</i>
Massachusetts	0,00517	1,0	3	3	0,00606	1,0	3	3
Maryland	-	-	1	1	NA	NA	NA	NA
Geórgia	0,01034	0,8	6	4	0,00000	0,0	3	1
Flórida	0,00637	0,964	8	7	0,00000	0,0	2	1
Panamá	0,01034	0,818	26	10	0,07879	1,0	6	6
Ceará	0,12873	0,910	13	9	0,09091	0,8	6	4
Bahia	0,11265	0,958	16	12	0,11439	1,0	4	4
Espírito Santo	0,07364	0,978	10	9	0,14167	0,833	4	3
Rio de Janeiro	0,11198	0,842	16	6	0,14591	1,0	5	5
São Paulo	0,08775	0,817	18	11	0,01818	1,0	4	4
Penha	0,06983	0,943	25	15	0,01364	1,0	5	5
Gov. Celso Ramos	0,08673	0,986	21	19	0,13561	0,833	4	3
Angola	0,16013	0,923	13	9	0,10379	1,0	4	4
Galápagos	0,00725	0,921	23	13	0,16818	1,0	2	2
Japão	0,00748	0,923	25	12	0,04237	1,0	8	8
Singapura	0,13281	0,844	30	9	0,13939	1,0	3	3
Índia	0,00872	1,0	4	4	NA	NA	NA	NA
Espanha	-	-	1	1	NA	NA	NA	NA
Israel	0,11009	1,0	9	9	0,00457	0,5	4	2
<b>Dados Totais</b>	<b>0,18076</b>	<b>0,9862</b>	<b>268</b>	<b>141</b>	<b>0,13280</b>	<b>0,9460</b>	<b>67</b>	<b>44</b>

Legenda: *sq*: número de sequências obtidas; *hp*: número de haplótipos encontrados; - não estimável devido a  $n = 1$ ; NA: não amostrado.

O teste de Mantel foi estatisticamente significativo ( $p = 0,01$ ). Em contra partida, a Regressão Linear ( $declive = 0,00023$ ,  $Rsqr = 0,048$ ) indicou que há pouca ou quase nenhuma relação entre as variáveis “distância mínima entre os locais de coleta” e “divergência máxima intraespecífica” para os dados de *S. canopus*. A interpretação do resultado do teste de Mantel deve ser cuidadosa, uma vez que há demonstrações empíricas de sua falibilidade (RAUFASTE & ROUSSET, 2001) e de sua acurácia (CASTELLANO & BALLETO, 2002), dependendo do conjunto de dados.

O resultado do teste exato para diferenciação das populações (RAYMOND & ROUSSET, 1995), baseado na frequência haplotípica entre as diferentes localidades, indicou heterogeneidade significativa na distribuição dos haplótipos de COI ( $p < 0,05$ ), confirmada pela elevada diversidade haplotípica verificada nas populações, tanto para os *locus* COI quanto para o *locus* ANT. Para o *locus* COI, a maioria dos haplótipos foi exclusiva da população amostrada (91,5%). Apenas 12 haplótipos foram observados em mais de uma população para este *locus*, sendo eles: *hap 1* (Bahia,

Angola e Israel), *hap 10* (Ceará e Espírito Santo), *hap 16* (Penha, Governador Celso Ramos, São Paulo e Singapura), *hap 25* (Penha, Governador Celso Ramos e Singapura), *hap 55* (Ceará, Bahia, Rio de Janeiro, Angola e Galápagos), *hap 56* (Ceará, Singapura e Israel), *hap 57* (Rio de Janeiro e Galápagos), *hap 58* (Ceará e Singapura), *hap 123* (Penha, Governador Celso Ramos e São Paulo), *hap 125* (Penha e São Paulo), *hap 127* (Penha, São Paulo e Angola) e *hap 131* (Penha e São Paulo). A relação entre fluxo gênico e diferenciação genética entre populações (WRIGHT, 1931) permite a investigação das fronteiras entre espécies usando estatísticas de fluxo gênico nas quais, sob o modelo de ilhas, o menor fluxo gênico entre populações sinaliza a diferenciação genética das populações (CHOI, 2016). Os valores de *Fst* entre os grupamentos verificados nas análises filogenéticas de COI são apresentados na Tabela 5. Todos os valores foram superiores a 0,93 e estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ).

A presença de substituições nucleotídicas diagnósticas pode sustentar a validade de uma possível espécie críptica (KEKKONEN & HEBERT, 2014) e já demonstraram ser aplicáveis e bem sucedidas na identificação de espécies (KELLY *et al.*, 2007; RACH *et al.*, 2008; WONG *et al.*, 2009). As populações do Panamá e do Japão apresentaram cada uma, seis substituições diagnósticas, e a Flórida uma (Fig. 4).

**Tabela 5.** Valores estimados de *Fst* entre os grupamentos formados pelas análises filogenéticas da COI. Método de distância: Tamura-Nei.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
<b>G1</b>	-											
<b>G2</b>	<b>0,971</b>	-										
<b>G3</b>	<b>0,952</b>	<b>0,956</b>	-									
<b>G4</b>	<b>0,988</b>	<b>0,977</b>	<b>0,971</b>	-								
<b>G5</b>	<b>0,975</b>	<b>0,973</b>	<b>0,951</b>	<b>0,988</b>	-							
<b>G6</b>	<b>0,975</b>	<b>0,975</b>	<b>0,964</b>	<b>0,980</b>	<b>0,965</b>	-						
<b>G7</b>	<b>0,974</b>	<b>0,974</b>	<b>0,958</b>	<b>0,984</b>	<b>0,968</b>	<b>0,936</b>	-					
<b>G8</b>	<b>0,981</b>	<b>0,979</b>	<b>0,972</b>	<b>0,985</b>	<b>0,980</b>	<b>0,975</b>	<b>0,976</b>	-				
<b>G9</b>	<b>0,965</b>	<b>0,964</b>	<b>0,949</b>	<b>0,978</b>	<b>0,958</b>	<b>0,965</b>	<b>0,956</b>	<b>0,973</b>	-			
<b>G10</b>	<b>0,965</b>	<b>0,965</b>	<b>0,953</b>	<b>0,971</b>	<b>0,958</b>	<b>0,964</b>	<b>0,962</b>	<b>0,970</b>	<b>0,959</b>	-		
<b>G11</b>	<b>0,978</b>	<b>0,967</b>	<b>0,945</b>	<b>0,988</b>	<b>0,978</b>	<b>0,971</b>	<b>0,972</b>	<b>0,982</b>	<b>0,956</b>	<b>0,962</b>	-	
<b>G12</b>	<b>0,984</b>	<b>0,975</b>	<b>0,958</b>	<b>0,988</b>	<b>0,983</b>	<b>0,973</b>	<b>0,977</b>	<b>0,982</b>	<b>0,973</b>	<b>0,965</b>	<b>0,971</b>	-

Valores em negrito:  $p < 0,05$ .





**Figura 4.** Resultados da análise de caráter diagnóstico, agrupados por região geográfica.



## DISCUSSÃO

A análise de sequências simples de DNA fornece uma abordagem eficiente para o reconhecimento de possíveis espécies (KEKKONEN & HEBERT, 2014; CHOI, 2016), principalmente quando associada a diferentes procedimentos operacionais que visam delimitar espécies a partir da análise de *locus* simples (PONS *et al.*, 2006; PUILANDRE *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013). Os resultados aqui apresentados demonstram que, para o conjunto de dados analisados, o fragmento de COI foi capaz de identificar conspícuas delimitações entre os clados formados, sustentadas pela congruência entre os métodos de análise filogenética e os de delimitação de espécies. A congruência entre os métodos pode ser vista como evidência da robustez das possíveis espécies, principalmente devido às suas diferentes bases teóricas e abordagens analíticas (CARSTENS *et al.*, 2013). Embora haja evidência de que os métodos coalescentes de delimitação de espécies não sejam capazes de distinguir, estatisticamente, a estrutura genética associada ao isolamento populacional dos limites interespecíficos (SUKUMARANA & KNOWLES, 2017), os três métodos de delimitação empregados contribuíram de forma relevante para a identificação de espécies crípticas em diferentes grupos de organismos marinhos, tais como Mollusca (JÖRGER *et al.*, 2012), Annelida (TABOADA *et al.*, 2017) e Echinodermata (LÓPEZ-MÁRQUEZ *et al.*, 2018), não havendo razão para duvidar de sua confiabilidade. Além do que, sete das 12 possíveis espécies crípticas (58,3%) são simpátricas, tal qual observado em *Ciona intestinalis* (SATO *et al.*, 2012). O fato de essas espécies ocuparem a mesma área geográfica, num mesmo período de tempo e virtualmente não apresentarem fluxo gênico (Tab.5), é uma forte evidência a favor da hipótese de especiação. Algumas dessas espécies podem ter evoluído através de especiação simpátrica (BUSH, 1994; VIA, 2001) ou terem especiado alopatricamente (JOHANNESSEN, 2001) e foram colocadas juntas através de eventos introdutórios e/ou dispersivos naturais.

Mesmo assim, é preciso considerar que as informações filogenéticas do mtDNA nem sempre são capazes de identificar as fronteiras das espécies, principalmente quando essas foram separadas recentemente (NEIGEL & AVISE, 1986), o que parece não ser o caso. Se tomarmos como exemplo o grupo G2 (Japão) recuperado na análise de *locus* simples (Fig. 1), o comprimento desse ramo e assumindo uma taxa de mutação de  $\mu = 0,02/\text{M.a.}/\text{locus}$  (BROWN *et al.*, 1979), podemos estimar um tempo de divergência para esse clado de cerca de 3 milhões de anos, tempo consideravelmente razoável para especiação. É verdade que as taxas de especiação variam ao longo do tempo, entre grupos taxonômicos e entre regiões geográficas (BARRACLOUGH & NEE, 2001). Todavia, os resultados indicam que os eventos genéticos que levaram à separação e isolamento das linhagens em *S. canopus* não são tão recentes. Além disso, a análise de vários estudos com diferentes grupos

de metazoários assegurou a validade da COI na discriminação de espécies estreitamente relacionadas em quase todos os filos, exceto Cnidaria (HEBERT *et al.*, 2003).

Aliás, as populações do Japão e do Panamá apresentam, cada uma, seis caracteres diagnósticos no fragmento de COI analisado, e Flórida, apenas um. Caracteres diagnósticos são substituições nucleotídicas discretas, dentro de uma sequência de DNA, através das quais espécies podem ser identificadas (RACH *et al.*, 2008). A presença desses caracteres corrobora a hipótese de especiação, ao menos para as populações do Japão e Panamá.

Por outro lado, a delimitação de espécies baseada em apenas um *locus* pode sofrer grandes variações. Por tal motivo, estudos filogenéticos mais recentes têm feito uso de abordagens *multilocus*, investigando a congruência entre diferentes *loci* na esperança de reduzir essa variação (CHOI, 2016). O uso de marcadores nucleares associados aos tradicionais mitocondriais tem ajudado a esclarecer os padrões ocultos da estrutura genética em populações naturais (PALUMBI & BAKER, 1994). A abordagem mitonuclear foi utilizada para investigar a diversidade genética da ascídia *Botryllus schlosseri* e apontou a existência de três espécies crípticas (BOCK *et al.* 2012). A equivalência entre os oito grupos recuperados pela análise da matriz concatenada (COI + ANT) com oito grupos recuperados pela análise isolada de COI demonstram a confiabilidade dos resultados obtidos com *Styela canopus*. Apesar disso, o uso da abordagem mitonuclear COI + ANT nem sempre é capaz de detectar diversidade críptica quando utilizada para acessar a diversidade genética em populações naturais (PINEDA *et al.*, 2011; SHEETS *et al.*, 2016). Mesmo assim, em alguns casos os estudos foram bem sucedidos. *Pyura stolonifera* havia apresentado elevada diversidade genética, revelando a existência de, pelo menos, cinco espécies distintas (TESKE *et al.*, 2011; RIUS & TESKE, 2011). Rius & Teske (2013) conseguiram, a partir do uso de COI + ANT e de análises morfológicas, desvendar parte do complexo específico *Pyura stolonifera* descrevendo, inclusive, uma nova espécie. Por outro lado, o grupo G3 da abordagem mitonuclear (Fig. 2) não foi suportado pela análise BSD. A utilização de uma árvore guia incorreta pode ter um grande impacto sobre os resultados da BSD, levando o algoritmo a interpretar todos os clados como espécies diferentes (LEACHÉ & FUJITA, 2010). No entanto, a BSD não identificou o Grupo 3 como uma espécie distinta, indicando que a árvore gerada pelo BEAST possivelmente não tenha sido fonte de imprecisão analítica.

Interessante observar que os haplótipos que compõem o grupo G3 (Fig. 1; G8 na Fig. 2) foram amostrados na área geográfica original de descrição de *Styela partita* (Stimpson, 1852), cujo espécime-tipo foi coletado na região portuária de Boston (VAN NAME, 1902). Atualmente, *S. partita* faz parte da sinonímia de *S. canopus*. No entanto, os resultados apresentados sugerem que *S. partita* possa ser uma espécie diferente de *S. canopus* e, com o suporte de novas evidências, talvez seja necessário recuperar a espécie retirando-a da sinonímia.

Estudos genético-populacionais de ascídias demonstram que os índices de variabilidade nucleotídica ( $\pi$ ) e de variabilidade haplotípica ( $h$ ) contribuem para com os estudos filogenéticos, na medida em que revelam a heterogeneidade na estrutura genética, sobre a qual atuarão os fatores evolutivos. Os valores de  $\pi$  e  $h$  verificados nas populações analisadas, tendo como referência as sequências de COI, são mais elevados do que aqueles verificados na maioria dos estudos com outras ascídias consideradas complexos de espécies crípticas. Em *Diplosoma listerianum* foram verificados os valores de  $\pi = 0,0984$  e  $h = 0,8770$  (PÉREZ-PORTELA *et al.*, 2013). Para *Clavelina lepadiformes* (Müller, 1776), Tarjuelo *et al.* (2001) encontraram valores de  $\pi = 0,0032$  e  $h = 0,682$  para as populações de mar aberto e  $\pi = 0,0018$  e  $h = 0,513$  para as populações localizadas em marinas. Por fim, valores de  $\pi = 0,0178$  e  $h = 0,527$  foram obtidos para as populações de *Botryllus schlosseri* (LÓPEZ-LEGENTIL *et al.*, 2006) e de  $\pi = 0,044$  e  $h = 0,912$  entre dois morfotipos de *Didemnum granulatum* Tokioka, 1954 (BOUZON *et al.*, 2014). É importante considerar a elevada diversidade haplotípica verificada em ambos os *loci* utilizados. Usando COI, Wong *et al.* (2011) verificaram elevada diversidade haplotípica (entre 0,6 e 0,8) em nove das 11 populações estudadas de *Mytilopsis sallei* (Récluz, 1849) (Mollusca, Bivalvia). Os autores concluíram que esses resultados sugeririam a existência de variabilidade genética suficiente para o uso do mtDNA para reconstruir a história de invasão de *M. sallei*. Portanto, a elevada diversidade haplotípica verificada nas populações de *S. canopus* nos permite concluir que há variabilidade genética suficiente nos dados obtidos para diferenciar possíveis espécies e para reconstruir parte da história de dispersão.

Além do mais, os valores de diversidade nucleotídica verificados nos dados totais de COI estão acima dos valores esperados para estudos intraespecíficos em Metazoa, onde o máximo observado foi um  $\pi$  de 0,01993 (GOODALL-COPESTAKE *et al.*, 2012). Por outro lado, é preciso considerar que as diversidades nucleotídicas e haplotípicas podem sofrer a influência da contaminação dos dados por pseudogenes, da subamostragem ou da inadvertida inclusão de espécies crípticas (GOODALL-COPESTAKE *et al.*, 2012). A presença de pseudogenes pôde, com certa segurança, ser afastada pela ausência de códons de parada nas sequências obtidas (BENSASSON *et al.*, 2001). Da mesma forma, não se pode creditar os altos valores de  $\pi$  e  $h$  observados à influência de subamostragem, uma vez que a baixa amostragem reduziria a variabilidade genética, e não ao contrário. De acordo com Goodall-Copestake *et al.*, (2012), um  $N$  superior a cinco espécimes seria suficiente para detectar extremos de variação genética no *locus* COI e  $N_s$  superiores a 25 amostras apenas trariam maior precisão às análises. Com base no exposto, concluímos que o esforço amostral nas populações de *S. canopus*, embora passível de melhora, teria sido capaz de detectar, com alguma acurácia, a variação genética. Por fim, a inclusão de espécies crípticas é, no presente estudo, a hipótese inicialmente a ser testada e, portanto, a variação

nucleotídica verificada pode ser um indicativo da presença de espécies crípticas no universo amostral.

Um dos aspectos de diferenciação entre espécies pode ser manifestado através do isolamento reprodutivo (WU, 2001). O procedimento tradicional para investigar o isolamento reprodutivo é estimar o fluxo gênico entre as populações, pois o menor fluxo gênico sinalizaria a diferenciação genética das populações (CHOI, 2016). Um método para estimar o fluxo gênico em populações naturais é estabelecer a divergência genética entre elas, cujo valor é determinado pela variância na frequência alélica entre as subpopulações através do índice *Fst* (HARTL & CLARK, 2010). Todavia, considerando o contexto de bioinvasão no qual está inserida *Styela canopus* e o cenário de especiação insipiente que se revela, não seria coerente estimar o fluxo gênico entre as populações amostradas, uma vez que a maior parte destas se assemelharia, estruturalmente, a comunidades resultantes da mistura provocada pelos eventos de introdução. Dessa forma, optou-se pela mensuração do *Fst* entre os grupamentos obtidos pelos métodos filogenéticos. Os valores observados de *Fst* entre os grupamentos encontrados indicam baixíssimo fluxo gênico entre as possíveis espécies aventadas (Tab. 5), reforçando a hipótese de isolamento reprodutivo. Interessante observar que os grupos G3 (costa leste dos EUA) e G4 (Panamá) da Figura 1 distam aproximadamente 2.035 km e não há barreiras geográficas claras entre as regiões. Sendo assim, seria esperado o compartilhamento de haplótipos entre as áreas. No entanto, ambas as regiões apresentaram haplótipos exclusivos e não compartilhados com nenhuma outra área, além de elevados valores de *Fst*, sugerindo fluxo gênico insignificante. Uma possível explicação desse isolamento seria a existência de barreiras ecológicas que estariam impedindo o estabelecimento de migrantes em função das diferenças ambientais (NOSIL *et al.*, 2005) ou da atuação de correntes marítimas como barreiras dispersivas (*e.g.* Corrente das Antilhas e Corrente Caribenha). Em contrapartida, é possível que mecanismos reprodutivos (*e.g.* ausência de reconhecimento entre os gametas, divergência nos tempos de reprodução) possam estar operando dentro e entre as populações levando ao distanciamento genético (PALUMBI, 1994). Fluxo gênico insignificante foi uma das evidências utilizadas para inferir a especiação críptica em *Clavelina lepadiformes* (TARJUELO *et al.*, 2001) e *Pseudodistoma crucigaster* Gaill, 1972 (TARJUELO *et al.*, 2004). Importante também ressaltar que, embora distantes (genética e geograficamente) e, teoricamente, isoladas pelo Istmo do Panamá, os haplótipos do Panamá guardam alguma relação evolutiva com os haplótipos do Japão (Fig. 3). Existem fortes evidências de rápido isolamento reprodutivo em populações estritamente alopátricas, separadas pelo Istmo do Panamá (PALUMBI, 1994). A formação do Istmo do Panamá foi um dos maiores eventos naturais do Cenozóico, conduzindo a profundas transformações na biota dos oceanos (O'DEA *et al.*, 2016). Estima-se que o Istmo do Panamá tenha se formado entre o final do Mioceno e o Pleistoceno médio (KEIGWIN, 1978), o que

fornece para nossa narrativa uma separação de, pelo menos, 2,8-3,0 M.a. entre as populações do Panamá e do Japão. O que temos até aqui é que três áreas geográficas estão aparentemente isoladas (Japão, Panamá e costa leste dos EUA), pois apresentam haplótipos simpátricos e não compartilhados com nenhuma outra área, indicando que estas espécies poderiam estar em suas áreas de origem.

Embora o isolamento geográfico tenha sido historicamente considerado imprescindível para o processo de especiação (ENDLER, 1977), a diversificação pode ocorrer em função de outros fatores. A evolução do isolamento reprodutivo é potencialmente influenciada por fatores genéticos, ecológicos, de desenvolvimento, comportamentais e ambientais (GAVRILETS & HASTINGS, 1996). Por exemplo, a hipótese ecológica de especiação prediz que o isolamento reprodutivo resulta da combinação de processos adaptativos em ambientes diferentes, podendo ocorrer em alopatria ou simpatria (SCHLUTER, 2001). Por sua vez, o ‘princípio do fundador’ (MAYR, 1942) tem sido utilizado para explicar muitos casos de especiação rápida. De acordo com esse modelo, o evento fundador pode, às vezes, levar a uma indução de desequilíbrio gamético como produto da endogamia. Se houver variabilidade genética suficiente na população fundadora, os sistemas genéticos multilocus podem responder à deriva e às forças seletivas, passando por uma rápida mudança para um novo pico adaptativo, conhecido como transiliência genética (TEMPLETON, 1980). Dessa forma, uma população isolada, com poucos indivíduos e que coloniza uma nova área, vivenciará mudanças nas pressões de seleção e na deriva genética, resultando no rápido deslocamento de muitos genes para uma nova combinação coadaptada, reprodutivamente isolada da população ancestral (BARTON & CHARLESWORTH, 1984). Ainda, o processo de hibridização pode acelerar a especiação via introgressão adaptativa ou causar especiação quase instantânea por aloploidia (ABBOT *et al.*, 2013). Embora a extinção seja o resultado mais provável da hibridização provocada pela ação humana (CRISPO *et al.*, 2011), a especiação por hibridização não pode ser descartada nos casos de introdução. Casos de introgressão genética já foram registrados entre as espécies crípticas da ascídia *Ciona intestinalis* (NYDAM & HARRISON, 2010b; ROUX *et al.*, 2013), demonstrando a potencialidade da hibridização como indutor de rápida especiação em ascídias.

Contrariando a premissa de que as distâncias genéticas e geográficas são correlacionadas umas com as outras (WRIGHT, 1943), os resultados indicam que a relação entre a distância genética e a distância geográfica para os dados de *S. canopus* é irrelevante. Esse resultado é condizente com o cenário de influência antrópica nos processos de dispersão, também corroborado pela falta de padrão na distribuição dos haplótipos em algumas áreas. O mesmo resultado foi encontrado em estudo filogeográfico de *Styela plicata* (PINEDA *et al.*, 2011), sugerindo que possa haver um padrão para ascídias relacionadas com processos de bioinvasão.



O compartilhamento de haplótipos nos permite identificar, com segurança, a existência de conectividade entre áreas geográficas. É possível observar mais de um haplótipo indicando as mesmas conexões. Os haplótipos *hap* 16, *hap* 25 e *hap* 123 compartilham localidades no estado de Santa Catarina (sul do Brasil) e Singapura; os haplótipos *hap* 16, *hap* 123, *hap* 125, *hap* 127 e *hap* 131 compartilham duas localidades no sul e sudeste do Brasil e os haplótipos *hap* 1, *hap* 56 e *hap* 58 compartilham localidades no nordeste brasileiro, Israel e Singapura. Uma vez que a taxa de invasão biológica em ecossistemas aquáticos costeiros depende do volume de tráfego de navios (RICCIARDI, 2001) é interessante correlacionar as regiões amostradas onde há compartilhamento de haplótipos com o transporte marítimo. Não é coincidência que todas essas regiões contenham portos ou estações marítimas com intensos fluxos aquaviários. As regiões de Penha e Governador Celso Ramos estão na rota dos navios que atracam no Porto de Itajaí (<http://www.portoitajai.com.br/>). A área de amostragem em São Paulo fica na região do Terminal Petrolífero da Petrobras (<http://www.petrobras.com.br/>) e na rota das embarcações que atracam no Porto de Santos (<http://www.portodesantos.com.br/>). No Ceará, foram coletadas na região do Porto do Mucuripe (<http://www.docasdoceara.com.br/>); na Bahia, na área portuária de Salvador (<http://www.codeba.com.br/>); em Singapura, nas cercanias do Porto de Singapura (<http://www.mpa.gov.sg/>) e, em Israel, nas instalações do Porto de Haifa (<http://www.haifaport.co.il/>). O Porto de Singapura é o primeiro lugar no ranking que contém os 20 portos com os maiores riscos de invasão (SEEBENS *et al.*, 2013) e está entre os sete caminhos mais importantes para o intercâmbio de espécies, atuando como epicentro para a troca interregional (DRAKE & LODGE, 2004). Entre os portos brasileiros o Porto de Santos (São Paulo) e o Porto de Tubarão (Espírito Santo) estariam entre aqueles que também desempenham relevante papel nas trocas de espécies entre regiões do planeta (DRAKE & LODGE, 2004; SEEBENS *et al.*, 2013). Além do mais, *S. canopus* já foi registrada aderida a cascos de navios (MILLAR, 1969; GEWING & SHENKAR, 2017), indicando o seu potencial para dispersão através da navegação comercial. O risco total de invasão por bioincrustação pode ser comparável ou superior ao da descarga de água de lastro (DRAKE & LODGE, 2007). Todavia, por outro ponto de vista, o compartilhamento de vários haplótipos pode também sugerir conectividade passada (PINEDA *et al.*, 2011). As informações obtidas através das filogenias indicam que os processos que levaram ao isolamento reprodutivo em diferentes linhagens de *Styela canopus* ocorreram em uma escala de milhões de anos. Dessa forma, é possível que parte da história de distribuição possa ter ocorrido em função de processos naturais de dispersão, anteriores a influência humana. Esses padrões contrastantes criam dificuldades que tornam a reconstrução da história filogeográfica de *S. canopus* repleta de incertezas.

Galápagos apresenta todos os seus haplótipos restritos ao grupo G10 e compartilha apenas dois haplótipos (*hap* 55 e *hap* 57) com regiões no Atlântico Sul. Esses resultados sugerem que a

população da Ilha Baltra (Galápagos) já esteve isolada das demais populações, porém, está sofrendo os efeitos dos processos de introdução. Desde o final da Segunda Grande Guerra, os Estados Unidos instalaram uma base naval na Ilha Baltra, o que aumentou o número de navios na região e, com o crescimento populacional, foi construído o Porto de Seymour na mesma ilha (KEITH *et al.*, 2016). Embora o arquipélago de Galápagos não esteja em uma região geográfica propícia à bioinvasão por ascídias (LINS *et al.*, 2018) existem importantes rotas introdutórias que passam pelas águas do Pacífico tropical em direção às costas pacífica e atlântica da América do Sul (SEEBENS *et al.*, 2013). Dessa forma, é provável que Galápagos represente o centro de dispersão e que os navios estejam transportando organismos de Galápagos para outras áreas, entre eles *S. canopus*. Resalta-se que este é o primeiro registro de *S. canopus* nas Ilhas Galápagos.

Por outro lado, outras localidades tem haplótipos bastante espalhados nos grupos e todos são ou compartilhados ou derivados. As populações de Angola, Singapura, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Penha e Governador Celso Ramos parecem estar recebendo haplótipos de várias linhagens distintas e, por isso, apresentam variabilidade nucleotídica maior do que outras regiões. Podemos supor que essas populações são resultantes de movimentos introdutórios. A introdução de espécies exóticas de ascídias tem sido recorrentemente reportada para o litoral brasileiro (LOTUFO, 2002; ROCHA & KREMER, 2005; MARINS *et al.*, 2010; SKINNER *et al.*, 2016), para Singapura (LEE *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2016; TOH *et al.*, 2017) e para Angola (NICOLAU, 2016; PESTANA *et al.*, 2017) demonstrando que essas áreas estão abertas para a bioinvasão. Embora haja o registro de ocorrência de *Styela plicata* nas águas de Luanda (PESTANA *et al.*, 2017), esse é o primeiro registro de *Styela canopus* para aquela região. Não foi possível identificar claramente as origens dos haplótipos introduzidos nessas populações. *Styela canopus* está tão amplamente distribuída (Fig. 1, Introdução Geral) que as populações nativas poderiam figurar em qualquer região da área de distribuição, inclusive em locais não amostrados.

Finalizando, é preciso destacar a relevante quantidade de haplótipos exclusivos verificados. Analisando sequências de COI, González-Wangüemert *et al.* (2015) verificaram 69,6% de haplótipos exclusivos em *Holothuria polii* (Delle Chiaje, 1823) (Echinodermata, Holoturia). O elevado número de haplótipos exclusivos pode ser o resultado do crescimento populacional ou de processos seletivos atuando sobre os *loci* gênicos (VERGARA-CHEN *et al.*, 2010). Por outro lado, os valores obtidos no teste *Tajima D* indicaram que ambos os *loci* são seletivamente neutros. A presença de haplótipos exclusivos existentes entre as localidades também sugeriria que algumas variáveis ambientais poderiam estar influenciando a diferenciação genética entre as populações (GONZÁLEZ-WANGÜEMERT & VERGARA-CHEN, 2014). Essa diversidade genética poderia fornecer a matéria-prima para a manutenção da diversidade em escalas de tempo evolutivas mais longas e também poderia fornecer a base para a adaptação a mudanças ambientais (SANFORD &

KELLY, 2011; GONZÁLEZ-WANGÜEMERT & VERGARA-CHEN, 2014), viabilizando a especiação.

## CONCLUSÃO

Estamos diante de um cenário complexo onde os resultados demonstram que existem diferentes linhagens genéticas independentes, algumas aparentemente isoladas em suas áreas geográficas (Panamá, Japão e costa leste dos EUA) e outras sendo influenciadas por introduções mediadas pela ação antrópica (Angola, Singapura, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Penha e Governador Celso Ramos). Por sua vez, o arquipélago de Galápagos parece que esteve isolado e passou a sofrer os efeitos das introduções marinhas.

Múltiplas linhas de evidências foram obtidas através de diferentes análises moleculares a favor da especiação críptica. Examinando *loci* mitocondrial e nuclear foi demonstrado que o táxon *Styela canopus*, na natureza, representa várias espécies. Tendo em conta que espécies são grupos de populações naturais inter cruzantes e isoladas reprodutivamente umas das outras, propomos a existência de, ao menos, sete possíveis espécies crípticas em *Styela canopus*. Por esse motivo, sugerimos que, a partir da publicação deste trabalho, o táxon passe a ser tratado como “complexo *Styela canopus*”. Ainda assim, não descartamos a necessidade de novos estudos, *e.g.* filogenômica, para agregar novas informações a essa questão.

Posto que reiterados estudos moleculares tenham indicado a existência de espécies crípticas, fica evidente a necessidade da reanálise morfológica de muitos *taxa* para que se possa tentar diferenciar e descrever as novas espécies. A descoberta de elevado número de espécies crípticas reforça a necessidade da taxonomia, morfológica e molecular, tanto para a melhor compreensão dos fenômenos evolutivos, quanto para a efetiva conservação da biodiversidade.



## CAPÍTULO II

### Elevada variabilidade morfológica em *Styela canopus* (Savigny, 1816): a dificuldade da taxonomia alfa em ascídias cosmopolitas.

#### RESUMO

Em um momento em que a maioria dos *taxa* ainda precisa de descrição e a lista de extinções está aumentando, o número de taxonomistas tradicionais está diminuindo. Isso talvez se deva, em parte, ao crescente uso de técnicas de sequenciamento de DNA. Por outro lado, a mesma tecnologia tem revelado um número significativo de espécies crípticas que necessitam de investigação e descrição. É o caso da ascídia solitária *Styela canopus*, que apresenta grande variabilidade morfológica externa, ampla distribuição geográfica e extensa sinonímia. O objetivo do presente estudo foi explorar a variabilidade morfológica de *Styela canopus* e verificar se caracteres morfológicos e morfométricos permitem discriminar populações e/ou possíveis espécies crípticas. Comprimento do corpo e número de vasos longitudinais foram os caracteres métricos com maior variabilidade. Por outro lado, diâmetro do tubérculo dorsal, diâmetro do ovócito e número de gônadas apresentaram discreta variação. A Análise de Variância indicou que há diferenças significativas interpopulacionais entre as médias dos caracteres morfométricos analisados. Todavia, não foi possível discriminar claramente nenhuma das populações através da Análise de Componentes Principais ou da Análise de Máxima Parcimônia. Em contrapartida, caracteres qualitativos como a cor da túnica na região próxima aos sifões, morfologia e tamanho dos folículos testiculares, número elevado de ovários e morfologia das escamas sifonais demonstraram serem bons caracteres taxonômicos diagnósticos, permitindo afirmar que espécimes do Japão, do Panamá e do Espírito Santo (Brasil) pertencem a espécies distintas de *Styela canopus*.

**Palavras-chave:** Morfometria; Variabilidade Fenotípica; Especiação incipiente.

#### INTRODUÇÃO

A taxonomia descritiva, ou taxonomia alfa, é muito mais do que apenas inventariar a biodiversidade do planeta. Ela estabelece as bases da sistemática filogenética e fornece o banco de dados necessário para a ecologia e conservação (WILSON, 2004). Por outro lado, e a despeito de sua importância, o número de taxonomistas vem se reduzindo gradativamente ao longo dos anos (DISNEY, 1998; HOPKINS & FRECKLETON, 2002; YEN & ITTERBEECK, 2016). Cada vez mais, os estudos têm feito uso do conceito de “morfoespécie”, útil em escala local, mas ineficiente em escala global (BEATLLE & OLIVER, 1994). Isso, em um cenário no qual cerca de 90% das espécies do planeta permanece desconhecida (DISNEY, 2000) e a perda por extinção tem sido acelerada (WORM *et al.*, 2006), eliminando espécies e suas histórias evolutivas (VERON *et al.*, 2015). Se considerarmos apenas o ambiente marinho, a situação não é diferente, pois se estima que entre 1/3 e 2/3 das espécies ainda precisam de descrição (APPELTANS *et al.*, 2012). Uma vez que

grande parte das espécies permanece não descrita, os esforços para catalogar e explicar a biodiversidade do planeta precisam ser priorizados (BICKFORD *et al.*, 2006).

A identificação correta das espécies compreende etapa crucial para qualquer estudo biologicamente significativo (GELLER *et al.*, 1997). A maioria dos dados utilizados na *praxis* taxonômica é morfológica e começa com algum tipo de agrupamento que, na maioria das vezes, é uma tentativa de reconhecer uma população geneticamente definida (SIMPSON, 1951). Por outro lado, a variação morfológica em muitos *taxa* não está correlacionada com a especiação, pois a especiação pode ocorrer na ausência de variação morfológica visível (TEMPLETON, 1981). Além do que, diferentes indivíduos em uma população podem estar adaptados a diferentes ambientes levando à coexistência de diferentes fenótipos, dependendo da diversidade de microhabitats (VAN VALEN, 1965).

Em contrapartida, estudos genéticos têm revelado um número significativo de espécies crípticas (GOLDSTEIN & DESALLE, 2010; JÖRGER & SCHRÖDL, 2013), acrescentando mais dificuldade à delimitação de espécies. Nesse caso, a dificuldade em estabelecer caracteres diagnósticos pode ocorrer porque muitas espécies crípticas estão sob estase morfológica (KNOWLTON, 2000; BICKFORD *et al.*, 2006) ou, ao contrário, devido ao resultado de demasiada variabilidade fenotípica, que pode obscurecer caracteres morfológicos específicos, determinantes para delimitar as espécies (MICKEVICH & JOHNSON, 1976). Além disto, em ascídias alguns caracteres taxonômicos são difíceis de observar, sobretudo em animais mal fixados e/ou pouco relaxados (TURON, 1987b). De qualquer forma, as espécies crípticas requerem ainda uma descrição morfológica para saírem do anonimato (SCHLICK-STEINER, 2007).

A longa lista de sinonímias para algumas espécies de ascídias cosmopolitas demonstra com que frequência a taxonomia tradicional não tem conseguido lidar com uma perspectiva de escala global (ORDÓÑEZ *et al.*, 2016), o que sugere que a taxonomia alfa das ascídias é distorcida pela excessiva aglutinação, com muitos *taxa* crípticos ainda por serem descobertos (KNOWLTON, 2000). Por outro lado, é preciso reconhecer o aspecto histórico, uma vez que grande parte dos sinônimos ocorreu em uma época na qual havia maiores dificuldades de comunicação, de acesso à bibliografia e a coleções biológicas e menos pesquisas em países em desenvolvimento. Resolver o problema taxonômico das ascídias que compõem um complexo de espécies e/ou com elevada variação morfológica e geográfica permanece um enorme desafio a ser resolvido (ZHAN *et al.*, 2015).

A taxonomia de *Styela canopus* tem sido tradicionalmente baseada em diferentes caracteres anatômicos, incluindo seu pequeno tamanho, a proximidade dos sifões e a presença de duas gônadas de cada lado do corpo. Todavia, a literatura tem relatado grande variabilidade nos caracteres morfológicos, dependendo da região onde os espécimes foram coletados, principal motivo da




















extensa sinonímia. Após analisar 25 espécimes coletados em vários pontos das Ilhas Bermudas, Van Name (1902), verificou grande variação em quase todos os caracteres, reconhecendo não estar certo de que o material representasse uma única espécie. Além disso, há evidências moleculares de que *S. canopus* seja um complexo de espécies (ver Cap. I). O objetivo do presente estudo foi explorar a variabilidade morfológica de *Styela canopus* e verificar se caracteres morfológicos qualitativos, merísticos e métricos, permitem discriminar populações localizadas em diferentes áreas geográficas e/ou possíveis espécies crípticas através de análises estatísticas e filogenéticas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem

Para estudar a variação morfológica em *Styela canopus*, espécimes maduros foram coletados em 19 áreas geográficas ao redor do mundo: uma do Atlântico Norte, quatro do Caribe, dez do Atlântico Sul e Tropical, uma do Pacífico Centro-Leste, duas do Pacífico Oeste-Norte e uma do Mediterrâneo (Tab. 1). As coletadas realizadas no Brasil foram feitas de acordo com as autorizações SISBIO nº 10011-1 e SISBIO nº 55157-1.

**Tabela 1.** Populações de *Styela canopus* amostradas no presente estudo.

Oceano/Mar	ID	País	Localidade	Latitude	Longitude	Ano	N
Atlântico Norte	MA		Massachusetts	41°31'36"N	70°39'47"O	2014	01
	ST		São Tomás	18°20'23"N	64°54'37"O	1973	05
Caribe	CR		Curaçao	17°3'0"N	61°48'0"O	1963	05
	MR		Martinica	14°40'0"N	61°0'0"O	1967	05
	PA		Panamá	9°20'26"N	82°14'26"O	2014	13
	CE		Ceará	3°42'36"S	38°28'24"O	2015	12
	BA		Bahia	12°58'21"S	38°30'49"O	2014	11
Atlântico Sul e Tropical	ES		Espírito Santo	20°19'7"S	40°17'56"O	2016	09
	RJ		Rio de Janeiro	22°57'17"S	43° 10'3"O	2017	02
	AR		Angra dos Reis	23°0'21"S	44°18'57"O	2014	07
	SP		São Paulo	23°46'52"S	45°23'49"O	2017	12
	PR		Paraná	25°50'41"S	48°34'44"O	2014	02
	PE		Penha	26°47'16"S	48°36'24"O	2014	10
	GR		Gov. Celso Ramos	27°18'53"S	48°33'33"O	2016	09
	AN		Luanda	8°37'58"S	13°13'32"L	2013	08
	GA		Galápagos	0°27'0"S	90°16'0"O	2016	13
	JP		Japão	34°32'0"N	136°59'0"L	2015	02
Pacífico Oeste-Norte	SI		Singapura	1°17'14"N	103°8'47"L	2015	08
Mediterrâneo	IR		Israel	32°49'12"N	35°0'16"L	2015	03

Em campo, os espécimes foram anestesiados com a adição de mentol à água do mar e, posteriormente, fixados em formaldeído 4%. Em laboratório, as amostras foram dissecadas segundo técnicas usuais para ascídias solitárias (RODRIGUES *et al.*, 1998), medidas e descritas. Os espécimes foram depositados na Coleção de Ascídias do Laboratório de Invertebrados Marinhos - Universidade Federal do Paraná, com exceção das amostras de São Tomás, Curaçao e Martinica, devolvidas ao depositário de origem (*Naturalis Biodiversity Center*).

### Morfometria

Para investigar as diferenças entre as populações amostradas, 19 caracteres morfológicos foram avaliados em uma análise morfométrica que consistiu na descrição dos espécimes levando-se em consideração características métricas e merísticas, padronizadas de acordo com as descrições abaixo (Quad. 1). Para a obtenção das medidas foram utilizados paquímetro e ocular graduada de um microscópio estereoscópico (Leica, MZ 125). Para evidenciar os caracteres morfológicos de interesse, o material biológico foi corado com Hematoxilina de Harris (HARRIS, 1900).

**Quadro 1.** Descritores anatômicos utilizados na morfometria de *S. canopus*.

Métricos	
CC	Comprimento do corpo: maior eixo longitudinal do corpo, sem túnica;
LC	Largura do corpo: maior eixo transversal do corpo, sem túnica;
CSO	Comprimento do sifão oral: eixo longitudinal, da base até a borda livre do sifão, 20x*;
CSA	Comprimento do sifão atrial: eixo longitudinal, da base até a borda livre do sifão, 20x*;
DTD	Diâmetro do tubérculo dorsal: maior eixo longitudinal do tubérculo dorsal, 40x*;
Oe1	Comprimento do menor ovário esquerdo: eixo longitudinal entre as extremidades ovarianas, 10x*;
Oe2	Comprimento do maior ovário esquerdo: eixo longitudinal entre as extremidades ovarianas, 10x*;
Od1	Comprimento do menor ovário direito: eixo longitudinal entre as extremidades ovarianas, 10x*;
Od2	Comprimento do maior ovário direito: eixo longitudinal entre as extremidades ovarianas, 10x*;
CE	Comprimento do estômago: eixo mediano, entre o término do esôfago e o início do intestino, 10x*;
DO	Diâmetro do ovócito: média ( $n = 5$ ) do maior eixo transversal do ovócito, 100x*, transiluminação.
Merísticos	
TO	Tentáculos orais: número total de tentáculos orais;
VLe	Vasos longitudinais: número total de vasos longitudinais do lado esquerdo;
VLd	Vasos longitudinais: número total de vasos longitudinais do lado direito;
Ge	Gônadas: número total de gônadas do lado esquerdo;
Gd	Gônadas: número total de gônadas do lado direito;
PLE	Pregas longitudinais do estômago: número total de pregas longitudinais no interior do estômago;
FM	Fendas por malha: maior número de fendas verificado em uma única malha;
LT	Lobos testiculares: maior número de lobos verificado em um único folículo testicular.

\* aumento em que a medida foi obtida.

### Análises Estatísticas

Inicialmente, os dados originais foram normalizados através da transformação *log* para reduzir as distorções na distribuição (ZHOU *et al.*, 1997) e tornar as variâncias de erro mais homogêneas (FERNANDEZ, 1992). Os dados morfométricos foram, então, submetidos à Análise de Correlação para se estabelecer o grau de relacionamento entre as variáveis pareadas (PEARSON,

1897) e verificar possíveis padrões morfológicos. Os níveis de significância foram ajustados segundo as correções sequenciais de Bonferroni (RICE, 1989). Para testar estatisticamente as diferenças entre as populações foi aplicada a Análise de Variância (ANOVA) sobre as variáveis morfométricas e o Teste de Tukey (TUKEY, 1953) segundo o algoritmo de Copenhaver-Holland (COPENHAVER & HOLLAND, 1988) para indicar efetivamente as populações que diferiram. Na realização da ANOVA os dados merísticos *Ge*, *Gd* e *LT* não foram incluídos, uma vez que a distribuição desses dados não foi normal. Também foram retiradas dessas análises as populações com menos de três exemplares (Paraná, Rio de Janeiro, Massachusetts e Japão). Por fim, foi aplicada a Análise de Componentes Principais (ACP) a fim de reduzir a dimensão do conjunto de caracteres e identificar os componentes que melhor descrevessem a variação entre as populações. Os componentes principais foram extraídos a partir de uma matriz de correlação e plotados em uma representação gráfica bidimensional com o intuito de detectar possíveis padrões nos dados (JOLLIFFE, 1986). Todas as análises estatísticas morfométricas foram feitas com o auxílio do programa PAST 3.19 (HAMMER *et al.*, 2001).

### **Análise Filogenética**

A análise filogenética de Máxima Parcimônia (MP) foi aplicada aos dados morfológicos e executada com o auxílio do programa TNT v. 1.5, que aplica a otimização de Farris (FARRIS, 1970) para analisar dados contínuos (GOLOBOFF *et al.*, 2008, GOLOBOFF & CATALANO, 2016). Foi executada a busca heurística utilizando novas tecnologias, que aplica três algoritmos diferentes para isolar e analisar cada setor das árvores mais parcimoniosas de maneira independente (GOLOBOFF, 1999). O número de gônadas de cada lado do corpo (*Ge* e *Gd*) e o número de lobos testiculares (*LT*) foram convertidos em categorias, pois sua distribuição foi discreta. Outros 14 caracteres discretos foram utilizados (Quad. 2), resultando em uma matriz com 32 caracteres, 16 contínuos (Supl. 4) e 16 discretos (Supl. 5). Os dados contínuos foram tratados sem discretização (GOLOBOFF *et al.*, 2006) e como aditivos, enquanto os caracteres discretos foram tratados como não aditivos (FERRER *et al.*, 2014). Todos os caracteres tiveram o mesmo peso. Dada à similaridade morfológica com *S. canopus* (OLIVEIRA-FILHO & LOTUFO, 2015), *Styela cearense* Oliveira-Filho & Lotufo, 2015 foi utilizada como grupo externo na análise.

Para avaliar o suporte dos ramos foi utilizado o suporte de Bremer, que indica quantos passos a mais são necessários para que um clado colapse (BREMER, 1988). Foram considerados bem suportados os ramos com Bremer  $\geq 2$ . O Teste de Templeton foi aplicado para determinar o quanto os dados das duas partições foram significativamente diferentes (TEMPLETON, 1983).

**Quadro 2.** Caracteres não contínuos e seus respectivos estados.

---

1.	Proeminência na borda anterior da escama: (0) bem desenvolvida (1) ausente/pouco desenvolvida;
2.	Testículos digitiformes: (0) presentes (1) ausentes;
3.	Testículos globosos: (0) ausentes (1) presentes;
4.	Testículos digitiformes mais longos: (0) ausentes (1) presentes;
5.	Número de gônadas do lado direito: (0) uma ou duas (1) mais que duas;
6.	Número de gônadas do lado esquerdo: (0) uma ou duas (1) mais que duas;
7.	Número máximo de lobos testiculares: (0) 1-6 (1) 7-12 (2) 13-18 (3) >18;
8.	Endocarpos sobre as alças intestinais: (0) ausentes (1) presentes;
9.	Ovários ramificados: (0) ausentes (1) presentes;
10.	Forma do ânus: (0) lobado (1) liso;
11.	Dobra na borda anal: (0) ausente (1) presente;
12.	Cor em torno dos sifões: (0) ausente (1) alaranjado (2) avermelhado (3) esverdeado (4) amarronzado;
13.	Aspecto da túnica: (0) predominantemente rugosa (1) predominantemente lisa;
14.	Papilas na túnica: (0) presentes (1) ausentes.
15.	Consistência da túnica: (0) coriácea (1) cartilaginosa;
16.	Posição do sifão atrial: (0) acima da ½ do corpo (1) na ½ do corpo (2) abaixo da ½ do corpo.

---

**RESULTADOS****Variação Qualitativa**

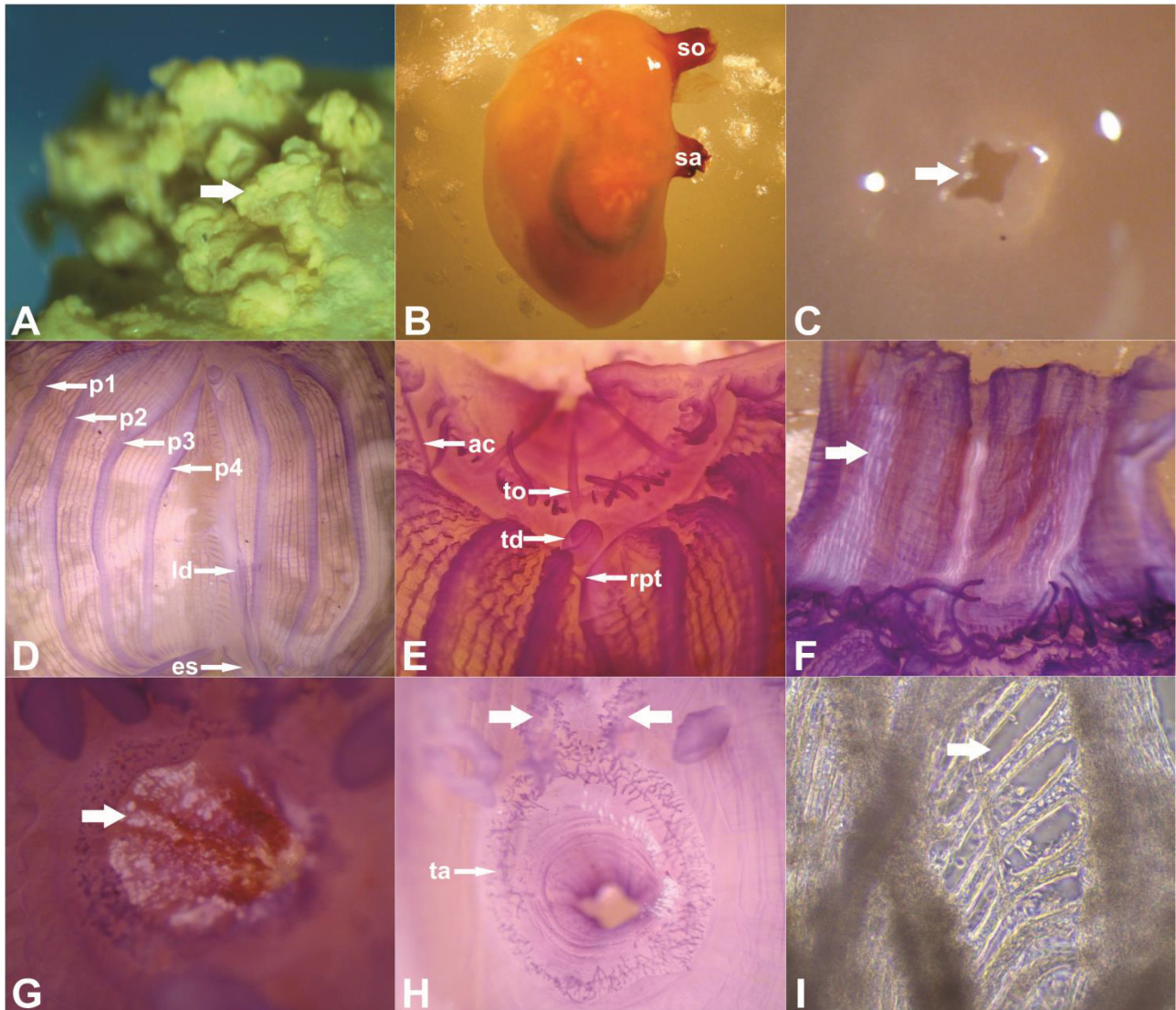
*Túnica.* O formato do corpo com a túnica variou entre oblongo e globoso, sendo o primeiro mais frequente (74,7% das amostras). A superfície dorsal da túnica é rugosa, com maior concentração de pigmentos, sendo que outras regiões da túnica podem apresentar-se rugosas ou lisas. A coloração da túnica foi variável, oscilando entre totalmente branca, branco amarelada, branco acinzentada, creme, creme esverdeada, marrom alaranjada e marrom avermelhada, em animais fixados no formol 4%. Projeções foram verificadas em vários espécimes, com notável desenvolvimento nas amostras do Ceará (Fig. 1A). A túnica apresentou aspecto coriáceo, raramente cartilaginoso (10,2% das amostras).

*Parede do Corpo.* Retirada a túnica, o formato do corpo foi sempre oblongo (Fig. 1B). Parede do corpo transparente a totalmente opaca, de coloração variável entre branca, branco amarelada, branco acinzentada, creme, creme amarelada, creme avermelhada e marrom avermelhada em espécimes fixados no formol 4%. Feixes de músculos longitudinais são frequentes (75,9% das amostras), mas não universais. Endocarpos são conspícuos e abundantes, distribuídos sobre a face interna da parede do corpo, entre as gônadas e tubo digestório. Em apenas três espécimes do Espírito Santo (ES07, ES08 e ES09) foram também verificados endocarpos sobre a segunda alça intestinal, embora poucos ( $\pm 7$ ).

*Sifões.* Os sifões são próximos, sendo o oral apical e o atrial lateral. O sifão atrial pode estar inserido um pouco acima ou um pouco abaixo da metade do corpo (Fig. 1B), raramente no meio. Cada sifão apresenta quatro lobos triangulares (Fig. 1C). Em ambos os sifões o revestimento interno apresenta fileiras de escamas e oito faixas brancas (Fig. 1F e 1G). Escamas apresentam o formato



triangular, com a borda anterior apresentando projeções bem desenvolvidas (Fig. 2I) ou pouco desenvolvidas/ausentes (Fig. 2H). Os tentáculos orais são filiformes, não ramificados e com três classes de tamanho, arranjados com certa regularidade (Fig. 1E). Múltiplos tentáculos atriais, filiformes e diminutos formam um anel do qual partem dois ramos em direção ao tubérculo dorsal (Fig. 1H). O anel ciliado é formado por membrana única, disposta em forma de ‘V’ na região peritubercular (Fig. 1E). Tubérculo dorsal apresenta fenda no formato de ‘C’ ou ‘U’ (Fig. 1E).

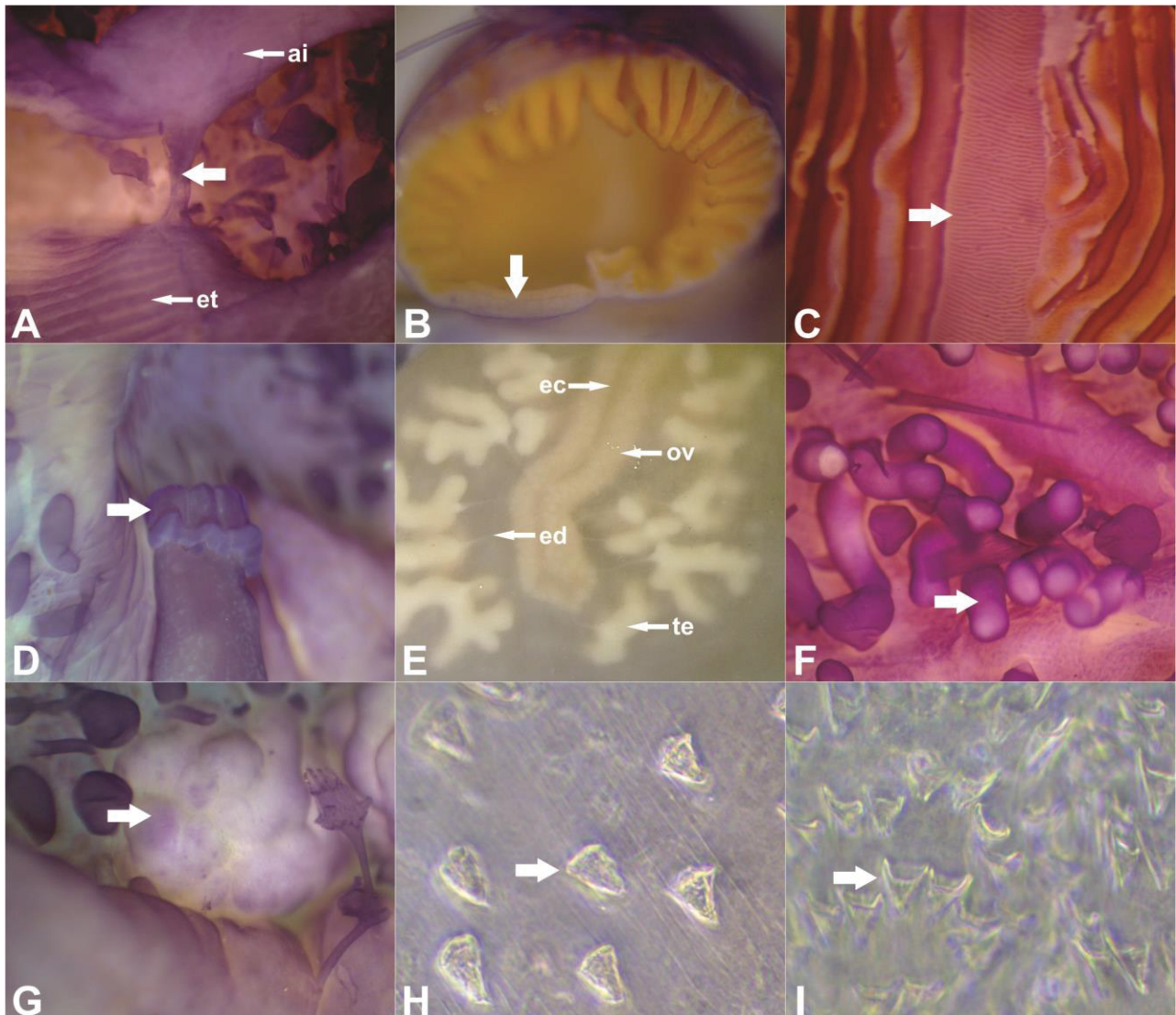


**Figura 1.** A. Detalhe da túnica indicando as projeções (seta); B. Vista lateral esquerda, sem a túnica; C. Lobos no sifão oral (seta); D. Vista geral da faringe; E. Detalhe da região oral; F. Revestimento interno do sifão oral indicando as fileiras de escamas (seta); G. Revestimento interno do sifão atrial indicando as fileiras de escamas (seta); H. Tentáculos atriais na base do sifão e nas projeções (setas); I. Detalhe da faringe indicando a fenda longitudinal (seta).

Legenda: *so*, sifão oral; *sa*, sifão atrial; *p1-p4*, pregas longitudinais da faringe; *ld*, lâmina dorsal; *es*, esôfago (abertura); *ac*, anel ciliado; *to*, tentáculo oral; *td*, tubérculo dorsal; *rpt*, região peritubercular; *ta*, tentáculos atriais.

**Faringe.** A faringe apresenta quatro pregas longitudinais de cada lado (Fig. 1D) com vasos longitudinais completos, vasos transversais com duas ordens de tamanho e vasos parastigmáticos

presentes. As fendas são longitudinais (Fig. 1I), variando de 5 a 22 (caso extremo) por malha (mediana = 11). Lâmina dorsal simples, inteira e de margem lisa, estende-se até o lado posterior esquerdo do esôfago, onde é mais larga (Fig. 1D).



**Figura 2.** A. Vaso sanguíneo entre o estômago e a primeira alça intestinal (seta); B. Corte transversal do estômago com dobras internas e indicando a região plana (seta); C. Estômago dissecado indicando a região plana (seta); D. Detalhe do ânus com a borda lobada e dobrada (seta); E. Gônadas e detalhe dos espermidutos; F. Folículo testicular digitiforme (seta); G. Folículo testicular globoso (seta); H. Escamas sifonais com projeções pouco desenvolvidas na margem anterior (seta); I. Escamas sifonais com projeções conspícuas na margem anterior (seta).

Legenda: *et*, estômago; *ai*, alça intestinal (1ª); *ov*, ovário; *te*, testículo; *ed*, espermiduto; *ec*, espermiduto comum.

*Tubo digestório.* O esôfago é frequentemente curto (80,7% das amostras), com menos de  $\frac{1}{4}$  do comprimento do estômago, mas às vezes é longo, com mais de  $\frac{1}{4}$  do comprimento estomacal. Estômago é alongado, com pregas longitudinais internas, partindo de uma região mais plana e larga, com estriamento transversal (Fig. 2B e 2C). Ceco gástrico e glândula digestiva ausentes. Primeira alça intestinal sempre forma ângulos fechados ( $< 45^\circ$ ), enquanto a segunda alça intestinal é



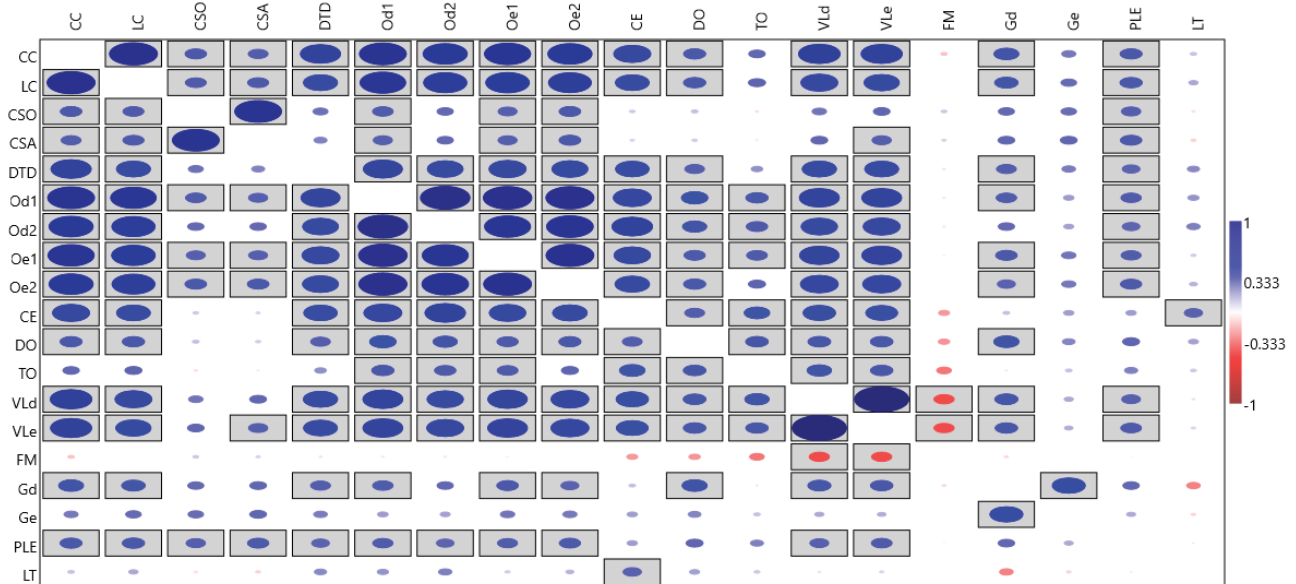
frequentemente fechada (84,3% das amostras) mas, algumas vezes, em ângulo aberto (45° - 90°). Tubo digestório liga-se à parede do corpo através de vasos sanguíneos sendo facilmente destacável. Existe um vaso sanguíneo entre o estômago e a primeira alça intestinal em aproximadamente metade dos espécimes (55,4%) (Fig. 2A). O ânus é liso, bilobado ou multilobado. Em alguns espécimes a borda anal apresentou-se dobrada sobre si mesma (AR01, AR02, AR04, SP02, IR03 e JP01), semelhante a uma “barra-de-calça” (Fig. 2D).

**Gônadas.** Os ovários são saculiformes, alongados, retilíneos a sinuosos, aderidos firmemente à parede do corpo, contendo ovócitos em diferentes estágios de maturação (Fig. 2E). Convergem todos em direção ao sifão atrial. Um ovário mais curto encontra-se total ou parcialmente dentro da segunda alça intestinal. Ovários ramificados foram observados em dois exemplares do Panamá (PA11 e PA13) e em três do Espírito Santo (ES07, ES08 e ES09). Numerosos folículos testiculares encontram-se distribuídos ao redor dos ovários, fracamente aderidos à parede do corpo e destacam-se facilmente (Fig. 2E). Os folículos apresentam formato digitiforme (Fig. 2F) ou globoso (Fig. 2G), podendo ambas as formas ocorrerem no mesmo indivíduo. Massas testiculares globosas e firmemente aderidas foram observadas apenas nos dois espécimes do Japão (JP01 e JP02). Espermiduto comum acompanha o eixo longitudinal dos ovários, na face voltada para a cavidade atrial e se abre próximo da abertura do gonoduto feminino (Fig. 2E). Não foi observada incubação em nenhum dos indivíduos analisados.

### **Variação Quantitativa**

Foram analisados 137 espécimes de *Styela canopus* (Supl. 4). Todas as variáveis quantitativas métricas apresentaram distribuição contínua. Dentre as variáveis merísticas, o número de gônadas, em ambos os lados (*Ge* e *Gd*), e o número máximo de lobos nos folículos testiculares (*LT*) apresentaram distribuição discreta (coeficiente < 0,9).

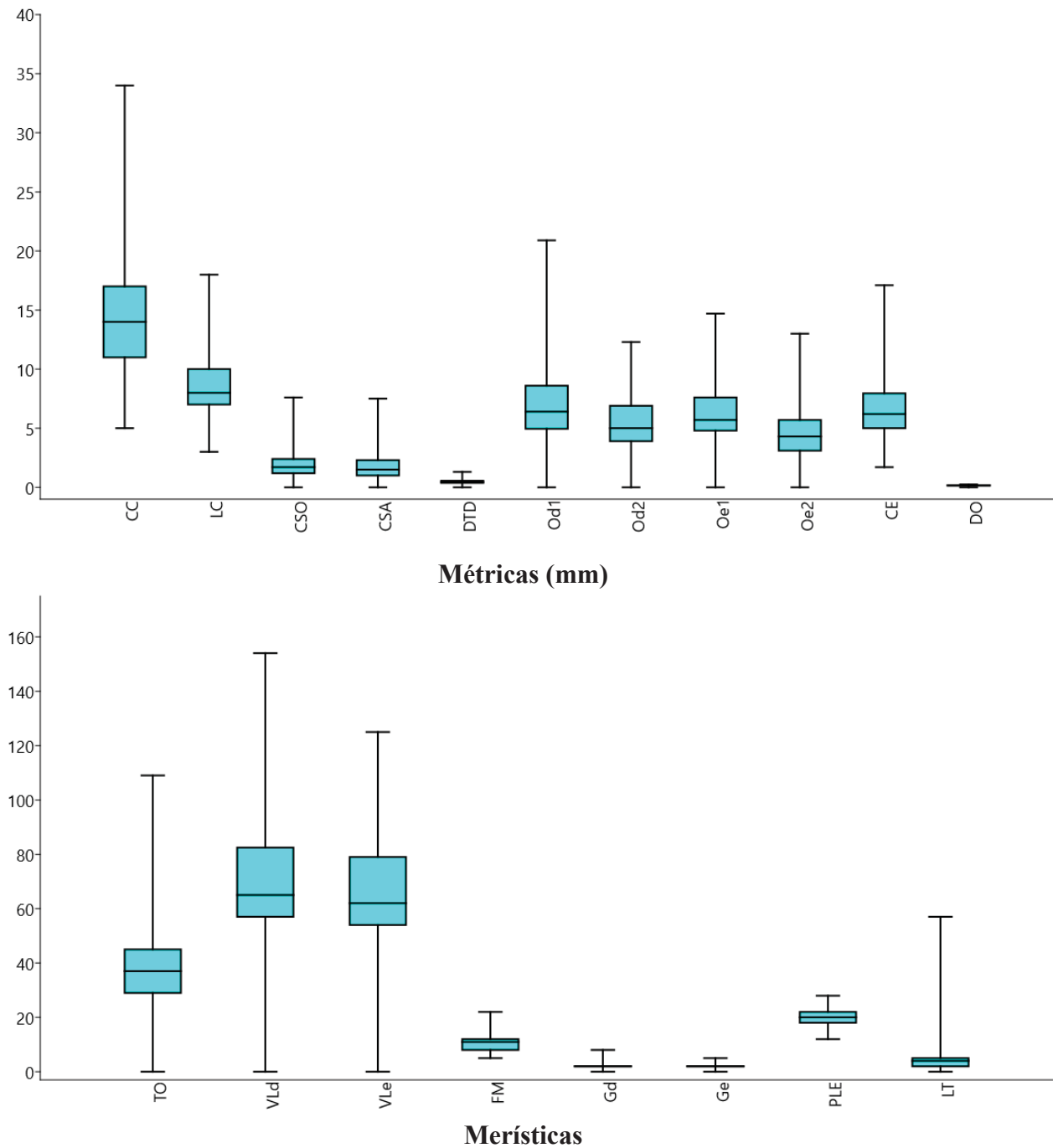
A Análise de Correlação demonstrou que a maior parte das variáveis morfométricas analisadas tiveram correlação positiva entre si (Fig. 3), especialmente com relação ao tamanho do corpo (*CC* e *LC*). As exceções foram o número de fendas por malha (*FM*) que apresentaram correlação negativa com o número de vasos longitudinais, tanto do lado direito quanto do lado esquerdo (*VLd* e *VLe*). Comprimento (*CC*) e largura do corpo (*LC*) apresentaram forte correlação entre si, assim como o comprimento do sifão oral (*CSO*) com o comprimento do sifão atrial (*CSA*), o número de vasos longitudinais em cada lado do corpo (*VLe* e *VLd*) e o número de gônadas em ambos os lados (*Ge* e *Gd*). Interessante observar que o número de pregas longitudinais no estômago (*PLE*) não teve correlação significativa com o comprimento do estômago (*CE*), mas teve correlação positiva intermediária com o número de lobos testiculares (*LT*).



**Figura 3.** Correlação estatística de Pearson entre as variáveis morfométricas. Caixa azul:  $p < 0,05$ .

Legenda: CC, comprimento do corpo; LC, largura do corpo; CSO, comprimento do sifão oral; CSA, comprimento do sifão atrial; DTD, diâmetro do tubérculo dorsal; Od1, comprimento do menor ovário direito; Od2, comprimento do maior ovário direito; Oe1, comprimento do menor ovário esquerdo; Oe2, comprimento do maior ovário esquerdo; CE, comprimento do estômago; DO, diâmetro do ovócito; TO, número de tentáculos orais; VLd, número de vasos longitudinais do lado direito; VLe, número de vasos longitudinais do lado esquerdo; FM, número de fendas por malha; Gd, número de gônadas do lado direito; Ge, número de gônadas do lado esquerdo; PLE, número de pregas longitudinais no estômago; LT, maior número de lobos testiculares.

Alguns caracteres foram muito variáveis (Fig. 4): comprimento e largura do corpo (CC e LC), o tamanho dos ovários em ambos os lados (Od1/2 e Oe1/2), o comprimento do estômago (CE), a quantidade de tentáculos orais (TO) e de vasos longitudinais em ambos os lados do corpo (VLe e VLd). Por outro lado, algumas variáveis morfométricas apresentaram pouca variação (Fig. 4), a saber: diâmetro do tubérculo dorsal (DTD), diâmetro do ovócito (DO), número máximo de fendas por malha (FM), número de gônadas, em ambos os lados (Ge e Gd) e o número de pregas longitudinais no estômago (PLE). A variação do comprimento dos sifões apresentou padrão semelhante em ambos, oral e atrial (CSO e CSA). Por outro lado, o número de gônadas foi discretamente mais variável do lado direito (Gd). Da mesma forma, o comprimento da maior gônada do lado direito (Od1) foi discretamente mais variável dentre as demais. De forma geral, os caracteres métricos foram mais variáveis do que os merísticos.



**Figura 4.** Variação dos dados morfométricos analisados em *Styela canopus*. As caixas mostram os quartis de 25 a 75 por cento. A mediana é mostrada como uma linha horizontal dentro da caixa. Os valores mínimo e máximo são mostrados com linhas horizontais curtas.

Legenda: CC, comprimento do corpo; LC, largura do corpo; CSO, comprimento do sifão oral; CSA, comprimento do sifão atrial; DTD, diâmetro do tubérculo dorsal; Od1, comprimento do menor ovário direito; Od2, comprimento do maior ovário direito; Oe1, comprimento do menor ovário esquerdo; Oe2, comprimento do maior ovário esquerdo; CE, comprimento do estômago; DO, diâmetro do ovócito; TO, número de tentáculos orais; VLD, número de vasos longitudinais do lado direito; VLe, número de vasos longitudinais do lado esquerdo; FM, número de fendas por malha; Gd, número de gônadas do lado direito; Ge, número de gônadas do lado esquerdo; PLE, número de pregas longitudinais no estômago; LT, maior número de lobos testiculares.

Os valores de  $p$  obtidos através da ANOVA demonstraram que para todas as variáveis analisadas houve diferença significativa entre as médias das populações (Tab. 3). O teste comparativo de Tukey indicou que as populações do Panamá, Singapura, Ceará e Martinica foram aquelas morfologicamente mais distintas das demais. Por sua vez, Espírito Santo, São Tomás e Israel foram as que apresentaram menores diferenças (Fig. 5). A classificação ordenada do acúmulo de diferenças foi a seguinte: PA > SI > CE > MR > AR = PE > SP > GR > GA > NA = BA = CR > ES = ST > IR. O caráter morfológico que apresentou o maior número de comparações significativas foi o diâmetro do ovócito ( $DO$ ). Em contra partida, o diâmetro do tubérculo dorsal ( $DTD$ ) foi o caráter com o menor número de comparações significativas. Os espécimes da Penha foram significativamente diferentes de todas as demais populações quanto ao número total de tentáculos orais ( $TO$ ).

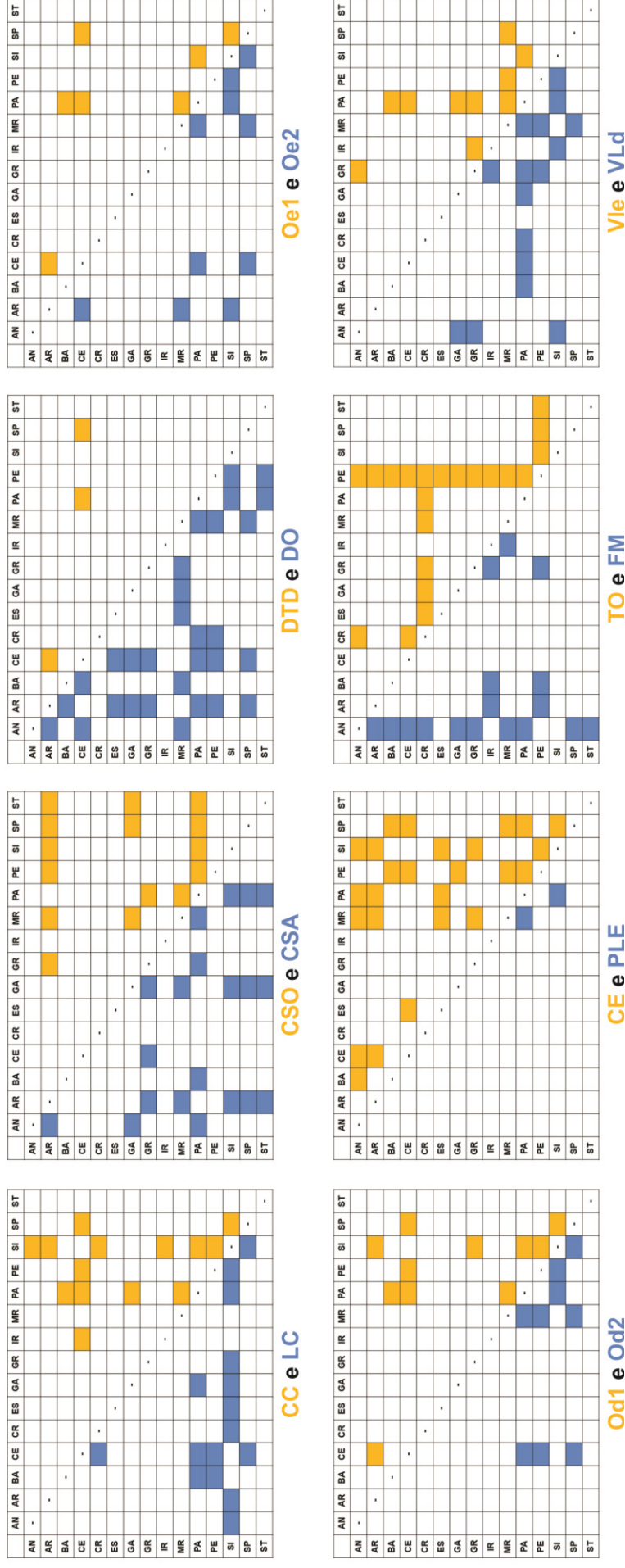
**Tabela 3.** Dados e componentes da ANOVA ( $\alpha = 0,05$ )

Variável Morfométrica	GL	SQ	F	p
CC (comprimento do corpo)	14	1,04	5,77	<0,001
LC (largura do corpo)	14	1,15	6,16	<0,001
CSO (comprimento do sifão oral)	14	2,77	5,21	<0,001
CSA (comprimento do sifão atrial)	14	4,33	6,82	<0,001
DTD (diâmetro do tubérculo dorsal)	14	0,74	2,72	0,002
Oe1 (comprimento do menor ovário esquerdo)	14	1,20	4,06	<0,001
Oe2 (comprimento do maior ovário esquerdo)	14	1,83	4,85	<0,001
Od1 (comprimento do menor ovário direito)	14	1,91	5,24	<0,001
Od2 (comprimento do maior ovário direito)	14	1,28	4,21	<0,001
CE (comprimento do estômago)	14	2,07	8,69	<0,001
DO (diâmetro do ovócito)	14	0,49	9,71	<0,001
TO (número de tentáculos orais)	14	1,88	9,71	<0,001
VLe (número de vasos longitudinais - lado esquerdo)	14	0,74	5,32	<0,001
VLd (número de vasos longitudinais - lado direito)	14	0,79	6,12	<0,001
PLE (número de pregas longitudinais do estômago)	14	0,12	2,18	0,013
FM (maior número de fendas por malha)	14	0,79	5,49	<0,001

Legenda: SQ. Soma dos quadrados; F. estatística F; p. significância.

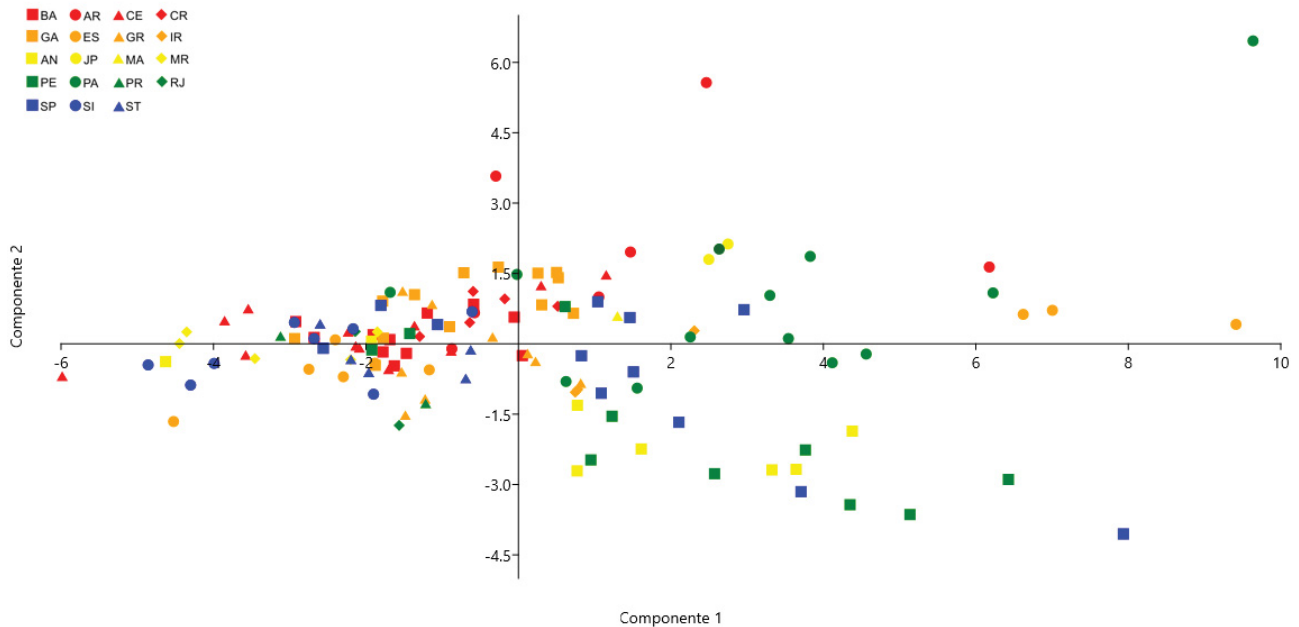
A Análise de Componentes Principais não foi capaz de discriminar claramente as populações a partir dos dados morfométricos (Fig. 6). Embora CP1 e CP2 representem juntos 64,2% (CP1 = 52,2%; CP2 = 12,0%) da variação dos dados, a distribuição das amostras (espécimes) no gráfico bidimensional (correlação CP1 vs CP2) não agrupou claramente nenhuma das populações, apontando para a falta de padrão detectável no universo amostral. De forma geral, os resultados obtidos através das diferentes análises quantitativas evidenciam o cenário esperado de elevada variabilidade morfológica com pouca resolução taxonômica e geográfica. Nossos dados indicam que, além da grande variabilidade morfológica externa (ABBOTT *et al.*, 1997), o complexo *S. canopus* também apresenta considerável variabilidade morfológica interna.





**Figura 5.** Resultados da comparação pareada de Tukey entre as variáveis morfométricas analisadas. Células preenchidas representam comparações significativamente diferentes.

Legenda: *AN*, Luanda; *AR*, Angra dos Reis; *BA*, Bahia; *CE*, Ceará; *CR*, Ceará; *ES*, Espírito Santo; *GA*, Galápagos; *GR*, Governador Celso Ramos; *IR*, Israel; *MR*, Martinica; *PA*, Panamá; *PE*, Penha; *SI*, Singapura; *SP*, São Paulo; *ST*, São Tomás; *CC*, comprimento do corpo; *CSO*, comprimento do sifão oral; *CSA*, comprimento do sifão atrial; *DTD*, diâmetro do tubérculo dorsal; *Od1*, comprimento do menor ovário direito; *Od2*, comprimento do maior ovário direito; *Oe1*, comprimento do menor ovário esquerdo; *Oe2*, comprimento do maior ovário esquerdo; *CE*, comprimento do estômago; *DO*, diâmetro do ovócito; *TO*, número de tentáculos orais; *VLd*, número de vasos longitudinais do lado direito; *VLe*, número de vasos longitudinais do lado esquerdo; *FM*, número de fendas por malha; *Gd*, número de gônadas do lado direito; *Ge*, número de gônadas do lado esquerdo; *PLE*, número de pregas longitudinais no estômago; *LT*, maior número de lobos testiculares.

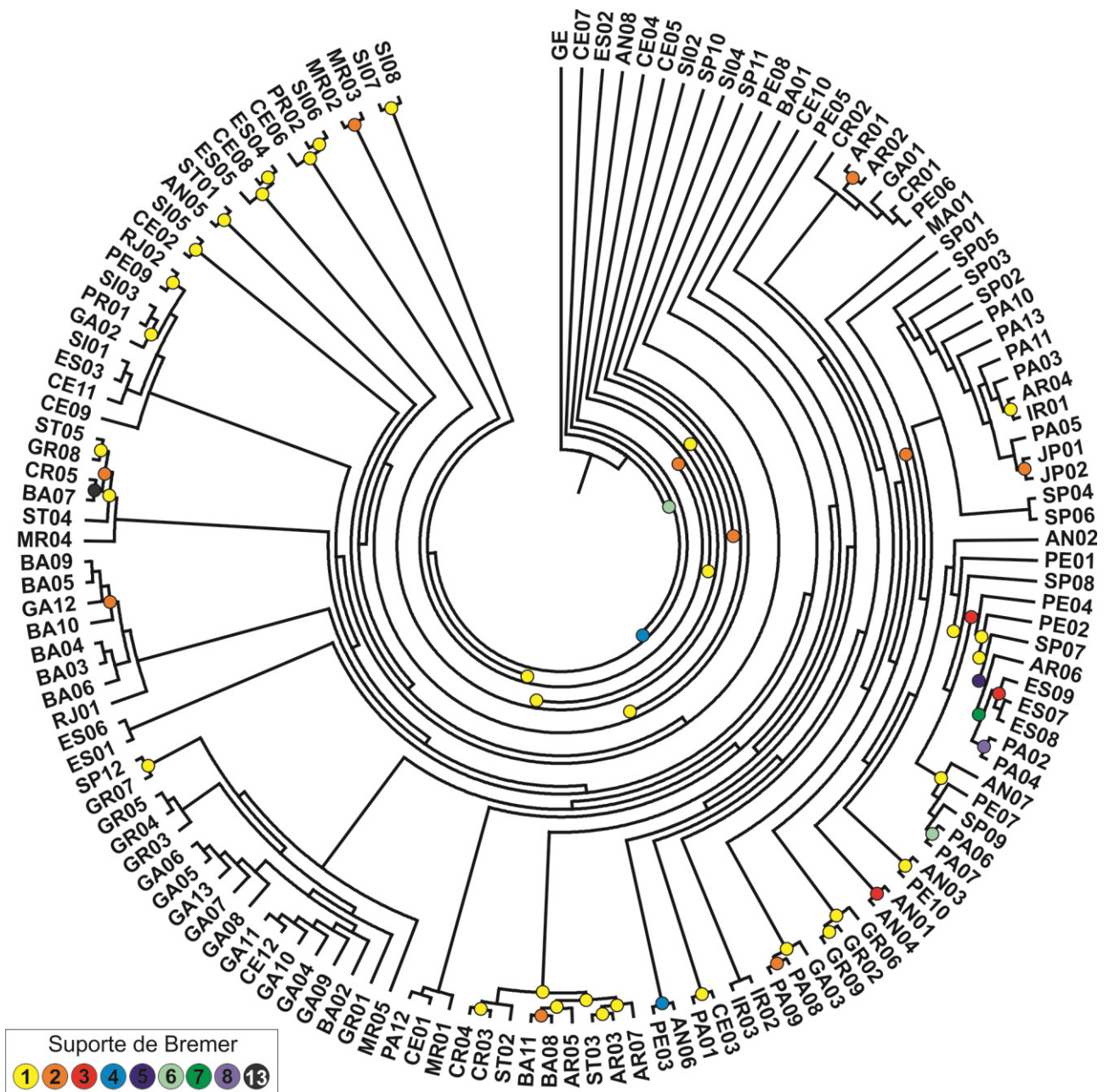


**Figura 6.** Mapa fatorial (CP1 vs CP2) dos espécimes amostrados de *Styela canopus*.

Resta ainda saber se, a despeito da significativa plasticidade morfológica verificada, há sinal filogenético dentre as variáveis morfológicas estudadas. Por esse motivo, os dados morfológicos foram submetidos à análise filogenética.

O resultado do Teste de Templeton indicou que os dados contínuos e discretos são combináveis, sendo que ao menos 19 caracteres diferem significativamente ( $p = 0,01$ ; 30 caracteres se  $p = 0,05$ ). A análise de Máxima Parcimônia (MP) da matriz com 32 caracteres recuperou uma única árvore ( $L = 1094$ ;  $IC = 0,155$  e  $IR = 0,663$ ) (Fig. 7). A topologia da árvore obtida indica a existência de algum sinal filogenético nos caracteres utilizados, porém com muitas homoplasias (FARRIS, 1989).

A análise de Máxima Parcimônia não foi capaz de recuperar claramente nenhuma das populações. A maioria dos grupos obtidos não apresentou suporte de Bremer (SB) significativo e reuniu duas ou mais áreas geográficas distintas. Entretanto, foram bem suportados os clados terminais que agruparam os seguintes espécimes: MR02 e MR03 ( $SB = 2$ ), ST05, GR08, CR05 e BA07 ( $SB = 2$ ), BA07 e CR05 ( $SB = 13$ ), BA05, BA09, BA10 e GA12 ( $SB = 2$ ), BA08 e BA11 ( $SB = 2$ ), PA08 e PA09 ( $SB = 2$ ), AN01 e AN04 ( $SB = 3$ ), PA06 e PA07 ( $SB = 6$ ), PA02 e PA04 ( $SB = 8$ ), ES07, ES08 e ES09 ( $SB = 3$ ), PA02, PA04, ES07, ES08 e ES09 ( $SB = 7$ ), JP01 e JP02 ( $SB = 2$ ) e AR01 e AR02 ( $SB = 2$ ).



**Figura 7.** Árvore obtida pela Máxima Parcimônia dos caracteres morfológicos de *Styela canopus*. São mostrados apenas os suportes de Bremer  $> 0$  (esferas coloridas nos nós).

## DISCUSSÃO

A considerável correlação que apresentaram entre si algumas das variáveis morfométrica (*CC* e *LC*; *CSO* e *CSA*; *VLe* e *VLd*) sugerem claramente que, embora *S. canopus* possa ter o formato do corpo influenciado pelas condições do ambiente onde está aderida (VAN NAME, 1945), existe certa relação anatômica entre determinadas dimensões do corpo que deve ser mantida durante o crescimento. Possivelmente, a correlação verificada entre o número máximo de fendas e comprimento do sifão oral seja produto apenas do acaso. Embora o fluxo de água no interior das ascídias seja determinado pela abertura dos sifões, uma vez que o trato ciliar nas fendas cria uma

corrente de água entre o sifão oral (inalante) e o sifão atrial (exalante) (RIISGARD, 1988), a abertura é regulada por ação muscular (HOYLE, 1952), independentemente do comprimento sifonal. A elevada variação morfológica do complexo *Styela canopus* é corroborada pelos resultados da ANOVA e da Análise de Componentes Principais. Os resultados dessas análises fazem sentido se consideramos que a maior parte das populações amostradas, na realidade, é composta por duas ou mais espécies crípticas e a plasticidade fenotípica existente não permite, ainda, sua discriminação.

De acordo com a literatura, o comprimento do corpo apresentaria grande amplitude, variando de 2 mm (TOKIOKA, 1961) a 30 mm em espécimes adultos (VAN NAME, 1902; ALDER & HANCOCK, 1907; BERRIL, 1950). O espécime-tipo tinha 40 mm de comprimento (SAVIGNY, 1816), porém este deve ser considerado um caso excepcional. Os comprimentos dos animais aqui analisados ficaram na faixa entre 5 e 29 mm. *Styela canopus sensu stricto* não deve ter mais do que 20 mm de comprimento (sem a túnica), animais com talhe maior do que esse valor, provavelmente pertencem à outra espécie do complexo *Styela canopus*. Nossos dados diferiram da literatura quanto ao número máximo de tentáculos orais. Nós observamos espécimes com até 103 tentáculos orais e a literatura relata uma variação entre 14 e 78 tentáculos (Tab. 5). Todavia, a mediana (37) ficou dentro dos valores esperados.

**Tabela 5.** Comparação entre alguns caracteres morfométricos entre sinônimas do complexo *Styela canopus*.

Táxon	CC	TO	Gd	Ge	PLE	FA	FM	LT	País	Referência
<i>Cynthia canopus</i>	40	24	2	2	20	M	?	M	Egito	Savigny (1816)
<i>Styela stephensoni</i>	6-7	48	2	2	15-19	M	4-5	2-3	África do Sul	Michaelsen (1934)
<i>Styela rectangularis</i>	10	24	2	2	?	M(9)	7-12	M	Austrália	Kott (1952)
<i>Styela barbaris</i>	38	14	2	2	?	M(6)	3-4	M	Austrália	Kott (1952)
<i>Styela partita</i>	15	35	2	2	15	M(11)	4-7	?	Japão	Tokioka (1960)
<i>Styela partita</i>	10	30	2	2	12	M	4-6	2-3	Costa Rica	Tokioka (1972)
<i>Styela partita</i>	20-30	56	2	2	20	?	3-7	?	Inglaterra	Berril (1950)
<i>Styela partita</i>	16-25	30	2	2	30	M(15)	4-6	?	N. Caledônia	Vasseur (1967a)
<i>Styela partita</i>	< 30	40-78	2	2	18-39	M(12)	8-14	?	Est. Unidos	Van Name (1902)
<i>Styela marquesana</i>	22	36-72	?	?	21-23	M	3-4	?	África do Sul	Millar (1955)
<i>Styela marquesana</i>	11-15	30	2	2	22-30	M	?	?	Madagascar	Plante & Vasseur (1966)
<i>Styela canopus</i>	10-20	?	2	2	18-30	?	2-3	?	Austrália	Kott (1985)

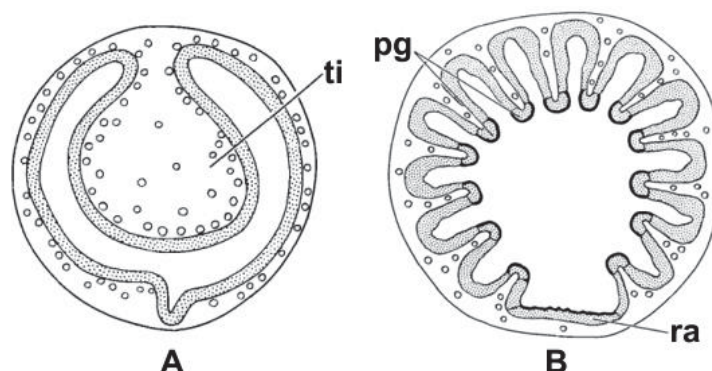
Legenda: CC. Comprimento do corpo em mm; TO. Número de tentáculos orais; Gd. Número de gônadas do lado direito; Ge. Número de gônadas do lado esquerdo; PLE. Número de pregas longitudinais no estômago; FA. Forma da borda anal; FM. Número de fendas por malha; LT. Número de lobos testiculares; M. multilobado; número entre parênteses = número de lobos.



São raras as descrições morfológicas de *S. canopus* nas quais o diâmetro do ovócito foi citado. Berril (1950) descreve um ovócito de 0,15 mm em um espécime da Inglaterra e Michaelsen (1934) reporta 0,2 mm para outro da África do Sul, concordantes com os valores encontrados na amostragem aqui realizada. Da mesma forma, o número máximo de fendas por malha e o número de pregas estomacais também estão de acordo com outras descrições já realizadas (Tab. 5). Uma vez que o número de pregas estomacais varia de acordo com a idade e o tamanho do animal (VAN NAME, 1902; TOKIOKA, 1954a), não dever ser considerado como um bom caráter taxonômico.

Michaelsen (1898) relata a existência de uma região diferenciada no estômago de uma *Styela* sp. proveniente do Chile, a qual denominou tiflossole. Tiflossoles também já foram relatadas para o estômago de outros Styelidae, e.g., *Asterocarpa coerulea* (Quoy & Gaimard, 1834) e *Styela plicata* (BREWIN, 1948) e *Amphicarpa prolifera* (Sluiter, 1905) (MONNIOT, 2002). No entanto, faltou aos autores descreverem a morfologia desta estrutura. Em *Styela clava* Herdman, 1881, a tiflossole foi descrita como uma dobra da parede intestinal, enquanto a área plana foi chamada de rafe (Fig. 8) (ERMAK, 1975). Considerando a natureza glandular das pregas estomacais (KOTT, 1985) e a morfologia da rafe verificada em *S. canopus*, uma região plana e não uma prega, é possível que esta possua função similar a rafe de algumas ascídias coloniais, isto é, uma área mucosa ao longo de um dos lados do estômago e que contém zonas germinativas de células mucosas (ERMAK, 1981).

A ligação existente entre o estômago e a primeira alça tem função incerta. Foi sugerido que possa ser um vaso sanguíneo ou uma glândula pilórica (ABBOT *et al.*, 1997). A mesma conexão foi descrita como sendo tecido conjuntivo em *S. cearense* (OLIVEIRA-FILHO & LOTUFO, 2015). Dada a natureza tubular da estrutura verificada em *S. canopus*, acreditamos que seja um vaso sanguíneo, tal como sugeriram os primeiros autores.



**Figura 8.** A. Tiflossole (*ti*) no intestino de *Styela clava*; B. Rafe (*ra*) e pregas (*pg*) no estômago *Styela clava*. Adaptado de Ermak (1975).

A assimetria no número de ovários em *S. canopus* não é usual (TURON, 1988b). A constância do número de ovários de cada lado demonstra que aqueles casos onde a quantidade

verificada foi diferente do que dois devem ser analisados. A descrição original estabeleceu que *S. canopus* tem um ou dois ovários de cada lado do corpo, logo, quatro no total máximo possível (SAVIGNY, 1816). Outros autores também relataram a variação no número de ovários, raramente maior do que dois para cada lado: um ovário do lado direito (TURON, 1988b; NISHIKAWA, 1991), um ovário do lado esquerdo, um ovário em ambos os lados (TOKIOKA & NISHIKAWA, 1975) e três ovários do lado direito (TOKIOKA, 1954b). Tokioka (1961) fez extensa análise acerca da variação do número de ovários em espécimes coletados na Nova Caledônia em 1958. Após a análise de 104 exemplares, verificou que 81,7% dos espécimes apresentavam dois ovários de cada lado, 17,3% menos de dois e, apenas 1 exemplar ( $\pm 1\%$ ), com quatro ovários do lado esquerdo, sendo um dos ovários ramificado (TOKIOKA, 1961). Os nossos resultados diferem pouco, principalmente com relação à assimetria, pois 5,8% das amostras tinham menos de dois ovários, 9,5% tinham mais de dois em um ou ambos os lados e 84,7% das amostras tinham dois ovários em cada lado.

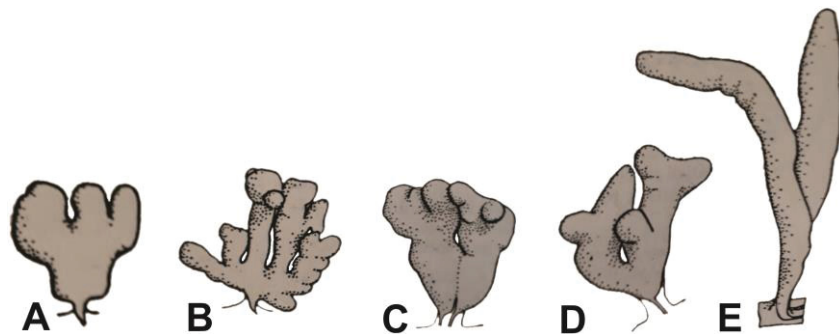
De acordo com Hartmeyer (1926), a existência de números diferentes de ovários em *S. canopus* seria apenas uma variação individual. Afirmação semelhante fez Tokioka (1961) ao considerar que a existência de quatro ovários em um único lado deve ser considerada uma notável anormalidade. Concordamos com os autores de que devam existir variações e, até mesmo anormalidades, em populações naturais. Todavia, é necessário correlacionar a variação do número de gônadas com outros caracteres, a fim de se identificar padrões morfológicos. Nesse sentido, propomos que a tendência a uma quantidade maior de ovários deva ser considerada como um potencial caráter taxonômico diagnóstico quando recorrente em uma determinada região. Espécimes com um número maior do que duas gônadas em um, ou ambos os lados foram encontrados apenas em Israel, Panamá e Espírito Santo. É possível que possam existir outras espécies do complexo *Styela canopus* também com duas gônadas em cada lado, por outro lado, a observação de um número maior de gônadas é fortemente sugestiva de que o espécime analisado não pertença à *Styela canopus sensu stricto*.

Em Styelidae, a morfologia das gônadas pode variar de acordo com a idade e com a maturidade do animal. Além disto, as gônadas apresentam uma gama intraespecífica variada de condições (KOTT, 1985). Por outro lado, ovários bifurcados são observações raras em *Styela canopus*. Foram descritos apenas em um espécime coletado em Woods Hole (Massachusetts, Estados Unidos) (VAN NAME, 1902) e em um indivíduo da Nova Caledônia (TOKIOKA, 1961).

Sabe-se que as gônadas constituem um importante caráter taxonômico em ascídias (TURON, 1987b). Todavia, a quantidade de testículos não foi considerada um bom caráter taxonômico por ser influenciada pelas condições ambientais que permitem que os animais atinjam a maturidade ainda com pequeno tamanho do corpo (TOKIOKA, 1954a). Da mesma forma, o número

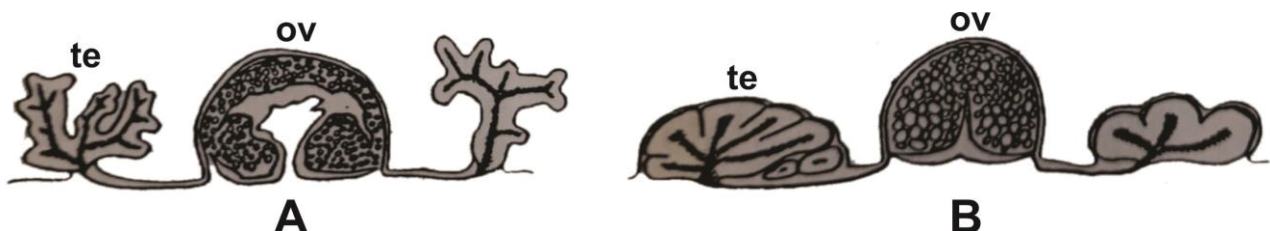


de lobos em cada folículo não é um bom caráter taxonômico uma vez que foi muito inconstante (1 a 27), variando, inclusive, dentro das populações. Em contrapartida, a morfologia dos folículos testiculares parece ter relevância taxonômica. De acordo com Hartmeyer (1926), haveria sete subtipos diferentes de *S. canopus* de acordo com a morfologia testicular. Nós verificamos ao menos três formas diferentes: digitiformes curtos, digitiformes longos e globosos. Digitiformes longos foram verificados apenas em três exemplares do Espírito Santo e se assemelham aos testículos de *Styela clavata* (Pallas, 1774), principalmente com relação ao comprimento e pequeno número de lobos (VAN NAME, 1945). Por sua vez, os digitiformes curtos foram diversificados em relação ao número de lobos, se assemelhando ao de outras espécies do gênero *Styela* (Fig. 9).



**Figura 9.** Diferentes morfologias dos folículos testiculares do gênero *Styela*. Digitiformes curtos: **A.** *Styela truncata* Ritter, 1901; **B.** *Styela canopus*; **C.** *Styela yakutatensis* Ritter, 1901; **D.** *Styela montereyensis* (Dall, 1872); Digitiformes longos: **E.** *Styela clavata*. Adaptado de Van Name (1945).

Os testículos do tipo globoso lembram os testículos de *Styela sigma* Hartmeyer, 1912 (Fig. 10B) e os de *Styela multitentaculata* Sanamyan & Sanamyan, 2006, como massas discretamente lobadas. No entanto, os testículos globosos verificados no complexo *Styela canopus* são maiores do que aqueles verificados em *S. sigma* (HARTMEYER, 1926) e ocupam posição anatômica diferente dos de *S. multitentaculata* (SANAMYAN & SANAMYAN, 2006), sendo laterais aos ovários e não terminais.



**Figura 10.** Comparação entre: **A.** testículos digitiformes de *Styela canopus*; **B.** testículos globosos de *Styela sigma*. Adaptado de Van Name 1945. Legenda: ov. ovário; te. testículo.

Seguramente, a coloração da túnica é um dos aspectos externos mais variáveis em *S. canopus*. Já foram descritas as seguintes colorações: esbranquiçada (TOKIOKA, 1972), branco

amarelada ou amarronzada (ALDER & HANCOCK, 1907), marrom esbranquiçada (KOTT, 1952), marrom amarelada (MICHAELSEN, 1898, 1934; BERRIL, 1950; TOKIOKA, 1955, 1960, 1962, 1967; MILLAR, 1970; TOKIOKA & NISHIKAWA, 1975; GHOBASHY & MESSEIH, 1991), marrom rosada (KOTT, 1985), vermelho amarronzada ou cinza com sífões laranja amarelados ou amarronzados (TOKIOKA, 1951), branco amarelada (TOKIOKA, 1953a, 1954b), marrom avermelhado (TOKIOKA, 1954a) e amarelo acinzentado (TOKIOKA, 1954b). A coloração da túnica em ascídias se dá através de células pigmentares e a distribuição dessas células resulta na formação de vários padrões de coloração (HIROSE, 2009). Embora variações relacionadas tanto à geografia quanto ao clima sejam observadas na morfologia da túnica das ascídias, seu aspecto geral tem um caráter quase uniforme em espécies relacionadas de Stolidobranchia (DI BELLA *et al.*, 1998), ordem a qual pertence os Styelidae. Da mesma forma, a estrutura celular das células pigmentares da túnica é bem diferente de espécie para espécie (HIROSE, 2009). Por conseguinte, em algumas situações, espécies muito similares podem ser separadas por diferenças sutis no padrão de cores (KNOWLTON, 2000), como foi observado nos estudos envolvendo *Botryllus niger* (Herdman, 1886) (ARON & SOLÉ-CAVA, 1991), *Herdmania momus* (Savigny, 1816) (DEGNAN & LAVIN, 1995), *Pyura praeputialis* (Heller, 1878) (DALBY, 1997) e *Didemnum granulatum* Tokioka, 1954 (BOUZON *et al.*, 2014). Embora o uso da coloração na taxonomia seja questionável, principalmente em função de sua subjetividade, tem sido um importante caráter taxonômico em alguns gêneros de ascídias (TARJUELO *et al.*, 2004; LÓPEZ-LEGENTIL *et al.*, 2005). Além disso, a coloração em dada espécie de ascídia pode ser relativamente constante, ou consistir em dois ou mais morfotipos. Os morfotipos podem estar sob controle genético e seriam úteis na identificação de espécies crípticas (WICKSTEN, 1989). A variação de cores é a diferença mais frequentemente relatada em *Cystodytes dellechiaiei* (Della Valle, 1877). A análise de sequências de COI revelou diferenças genéticas significativas entre dois morfotipos de cores diferentes em *C. dellechiaiei* (LÓPEZ-LEGENTIL & TURON, 2006). Dessa forma, quando associada a outros caracteres, a coloração pode ser um relevante fator na identificação de espécies, em especial no complexo *Styela canopus*.

Projeções na túnica já foram descritas como tubérculos grosseiros (ALDER & HANCOCK, 1907), mamilas (BERRIL, 1950), verrugas (MICHAELSEN, 1934) e protrusões mamilares em adultos (DI BELLA *et al.*, 1998) e também em indivíduos jovens (DI BELLA & DE LEO, 2014). A presença de projeções na túnica de jovens e adultos de *S. canopus* sugere que esse caráter não tenha relação com a idade do animal, logo, possa ter valor taxonômico. Contudo, seria necessária a padronização da nomenclatura para se evitar descrições dúbias.

Endocarpos sobre a primeira alça intestinal (dois a quatro) haviam sido mencionados apenas por Tokioka (1954a) em população nas Ilhas Tokara, Japão. *Styela canopus sensu stricto* não

apresenta endocarpos sobre as alças intestinais e, por esse motivo, acreditamos que os exemplares descritos por Tokioka podem pertencer a uma espécie diferente. A distribuição de endocarpos foi utilizada por Kott (1964) para diferenciar as espécies *Polyandrocarpa australiensis* Kott, 1952 e *P. triggiensis* Kott, 1952. Nós verificamos endocarpos sobre a alça intestinal em apenas três exemplares coletados no Espírito Santo. Dessa forma, acreditamos que presença ou ausência de endocarpos sobre o tubo digestório possa ser utilizada para diferenciar espécies do complexo *Styela canopus*. Tokioka (1951) também havia relatado a ausência de tentáculos atriais em população na Baía de Osaka (Japão), o que sugere uma possível espécie críptica, já que os mesmos foram observados em todos os indivíduos aqui estudados.

Espinhos sifonais são utilizados para a diferenciação de espécies dos gêneros *Microcosmus* e *Pyura* (Pyuridae), devido à sua constância morfológica intraespecífica e facilidade de observação. Por exemplo, os pares de espécies *Microcosmus vulgaris* Heller, 1877 e *Microcosmus sabatieri* Roule, 1885, *Microcosmus claudicans* (Savigny, 1916) e *Microcosmus savigny* Monniot C., 1962 e *Microcosmus exasperatus* Heller, 1878 e *Microcosmus squamiger* Michaelsen, 1927 apresentam elevada similaridade externa e interna e só podem ser diferenciados por meio dessas estruturas (TURON, 1987b; GEWING *et al.*, 2016). Apesar de ter se revelado uma característica relativamente complexa e que exige paciente observação, as escamas sifonais do complexo *Styela canopus* apresentam suficiente diferenciação na morfologia da borda anterior (borda livre) para serem consideradas um bom caráter taxonômico específico. Além do mais, indivíduos simpátricos apresentaram morfologia diferente (Supl. 4), sugerindo que não seja um caráter influenciado pelo ambiente. Todavia, uma análise mais detalhada envolvendo, por exemplo, medições, deve refinar esse caráter.

A análise filogenética recuperou poucos clados monofiléticos bem suportados. Diferentes hipóteses competem como possíveis explicações dos resultados observados:

- a) O número de caracteres utilizados pode não ter tido resolução suficiente para discriminar as populações/espécies. Embora seja difícil precisar o número de caracteres necessários para a reconstrução acurada de uma filogenia (SCOTLAND *et al.*, 2003), foram utilizados os principais caracteres morfológicos disponíveis para o gênero *Styela*, além de caracteres morfométricos, não usualmente utilizados na sistemática de ascídias;
- b) Outra possibilidade seria a de que pode ter havido inconsistência entre os caracteres utilizados (POE & WIENS, 2000). No entanto, o teste de Templeton indicou que os caracteres contínuos eram combináveis com os caracteres discretos. Além do mais, tivemos o cuidado de não categorizar arbitrariamente os dados contínuos, apenas aqueles com distribuição discreta;

- c) Por sua vez, da mesma forma que a variabilidade morfológica das ascídias tem frustrado o estabelecimento das relações claras entre algumas famílias e gêneros (PÉREZ-PORTELA *et al.*, 2009), o uso de dados morfológicos descritivos e morfométricos simplesmente não teria sido capaz de estabelecer diferenças populacionais/específicas claras para o complexo *Styela canopus*. As diferenças morfológicas seriam tão sutis que morfotipos seriam indistinguíveis por métodos sistemáticos morfológicos e, portanto, requereriam o uso de técnicas moleculares para sua identificação (COOK *et al.*, 2010), pois espécies morfológicamente similares podem ser distintas geneticamente se apresentarem diferenças claras na história de vida (KNOLTON, 2000);
- d) Por fim, a introdução de organismos não nativos pode provocar mudanças na composição das populações (ANIL *et al.*, 2002), realocando em uma mesma área espécies relacionadas que outrora estavam separadas por mecanismos naturais. Dessa forma, a alteração da estrutura genética por introgressão (HUXEL, 1999) pode levar ao surgimento de fenótipos desviantes (SOUISSI *et al.*, 2017) que confundem os estudos taxonômicos.

Por outro lado, o resultado verificado é condizente com a hipótese de especiação incipiente. A descrição da espécie é quase sempre feita no tempo presente, às vezes sem considerar que espécies são entidades temporais, linhagens históricas com um começo (especiação) e um fim (extinção) (ZACHOS, 2015). Dessa forma, quando o taxonomista descreve uma espécie ele acaba, por razões práticas, desconsiderando em que ponto do processo histórico encontra-se aquela entidade biológica. A especiação eventualmente ocorre de forma abrupta. É, geralmente, um processo adaptativo que envolve o estabelecimento de barreiras ao fluxo gênico entre populações intimamente relacionadas pelo desenvolvimento de mecanismos de isolamento reprodutivo (BUSH, 1975). Há evidências abundantes de que o padrão de disjunção reprodutiva entre os táxons não necessariamente se correlaciona com a história de sua diferenciação (CRACRAFT, 1983). Dessa forma, é possível que espécies já estabelecidas, *sensu* Conceito Biológico de Espécie, não apresentem evidências morfológicas suficientes para que o taxonomista possa diferenciá-las. Para complicar ainda mais, no momento da descrição as linhagens-filhas podem estar ainda se distanciando (*gray zone*) e não se tornaram feneticamente distinguíveis e diagnosticáveis (DE QUEIROZ, 2007).

Por tais motivos, nem sempre as filogenias morfológicas concordam com as moleculares, como demonstram os estudos com *Diplosoma listerianum* (Milne-Edwards, 1841) (PÉREZ-PORTELA *et al.*, 2013) e *Clavelina lepadiformis* (Müller, 1776) (TARJUELO *et al.*, 2001). Ainda assim, a análise filogenética baseada na morfologia de indivíduos do complexo *Styela canopus* foi capaz de recuperar, com certa confiabilidade, unidades taxonômicas distinguíveis no Japão, no Espírito Santo e no Panamá. A taxonomia e a sistemática de ascídias é um trabalho complexo,

principalmente porque caracteres apomórficos são pouco frequentes, comparados a uma profusão de caracteres homoplásticos. Dessa forma, a identificação de espécies depende, frequentemente, da experiência do pesquisador e de sua capacidade e sensibilidade para identificar sutis diferenças.

## CONCLUSÃO

A análise detalhada da anatomia externa e interna de 19 populações de *Styela canopus* não foi capaz de discriminar as populações devido à elevada variabilidade morfológica observada. Entretanto, alguns caracteres demonstraram ter potencial taxonômico. O uso da coloração da túnica, da morfologia das escamas sifonais, do tamanho e morfologia dos folículos testiculares, do número elevado de ovários, bem como do padrão de distribuição dos endocarpos permitem afirmar que espécimes do Panamá e do Espírito Santo e, possivelmente do Japão, devem pertencer a espécies diferentes daquela reconhecida como *Styela canopus*.

Não é coincidência que, ao menos para Panamá e Espírito Santo, os indivíduos que fugiram ao padrão do número de ovários também apresentaram outros caracteres em comum. Os três indivíduos do Espírito Santo com número de ovários maior do que quatro, são os únicos a apresentarem a túnica esverdeada na região dorsal e endocarpos sobre as alças intestinais. Da mesma forma, os espécimes oriundos do Panamá apresentaram um padrão avermelhado característico na região dorsal da túnica, onde também são verificadas pequenas e delicadas projeções nas bordas dos sifões. Além disso, as escamas sifonais desses mesmos espécimes apresentaram a morfologia da borda livre diferenciada em relação à maioria dos exemplares analisados.

## CAPÍTULO III

### Duas novas espécies de *Styela* (Tunicata, Ascidiacea) registradas no Oceano Atlântico.

#### RESUMO

Duas novas espécies do gênero *Styela* são descritas. A morfoespécie A é descrita a partir de espécimes coletados em Bocas del Toro, costa atlântica do Panamá, e a morfoespécie B foi coletada no Espírito Santo, Brasil. Essas novas espécies são caracterizadas pela túnica espessa e pigmentada, pela presença de mais de duas gônadas de cada lado e por espinhos sifonais pequenos e triangulares, cuja borda livre apresenta projeções ausentes ou pouco desenvolvidas. A morfoespécie A é relativamente comum em ambientes naturais e antrópicos do Arquipélago de Bocas del Toro, enquanto a morfoespécie B foi encontrada exclusivamente no Iate Clube de Vitória.

**Palavras-chave:** Ascídias; Taxonomia; Styelidae.

#### INTRODUÇÃO

A família Styelidae Sluiter, 1885, está entre as famílias mais diversificadas da Ordem Stolidobranchia Lahille, 1886. Compreende 38 gêneros e mais de 500 espécies, entre formas coloniais e solitárias (SHENKAR & SWALLA, 2011). Seus membros são caracterizados pela presença de quatro lobos nos sifões, tentáculos simples e filiformes, lâmina dorsal contínua, fendas retas e longitudinais e, habitualmente, quatro pregas longitudinais em cada lado da faringe (VAN NAME, 1945). O gênero *Styela* Fleming, 1822, é caracterizado pela morfologia das gônadas, nas quais os folículos testiculares não estão recobertos por uma membrana e se projetam lateralmente aos ovários (KOTT, 1985). Existem 71 espécies válidas para o gênero *Styela* (SHENKAR *et al.*, 2018). Todavia, apenas cinco espécies apresentam um número maior do que duas gônadas de cada lado. No presente estudo, nós descrevemos duas novas espécies de *Styela* com número maior do que quatro gônadas.

#### DESCRIÇÕES

##### Morfoespécie A.

(Figuras 1 e 2)

**Material tipo.** Holótipo: PA01, substrato artificial, Ilha Solarte, Bocas del Toro, Panamá (9°18'0" N, 82°11'0" O), 04 de agosto de 2003. Parátipos: PA02 e PA03, substrato artificial, Ilha Colon, Bocas del Toro, Panamá (9°23'15"N, 82°15'30" O), 09 de agosto de 2003; PA04 e PA05 ,



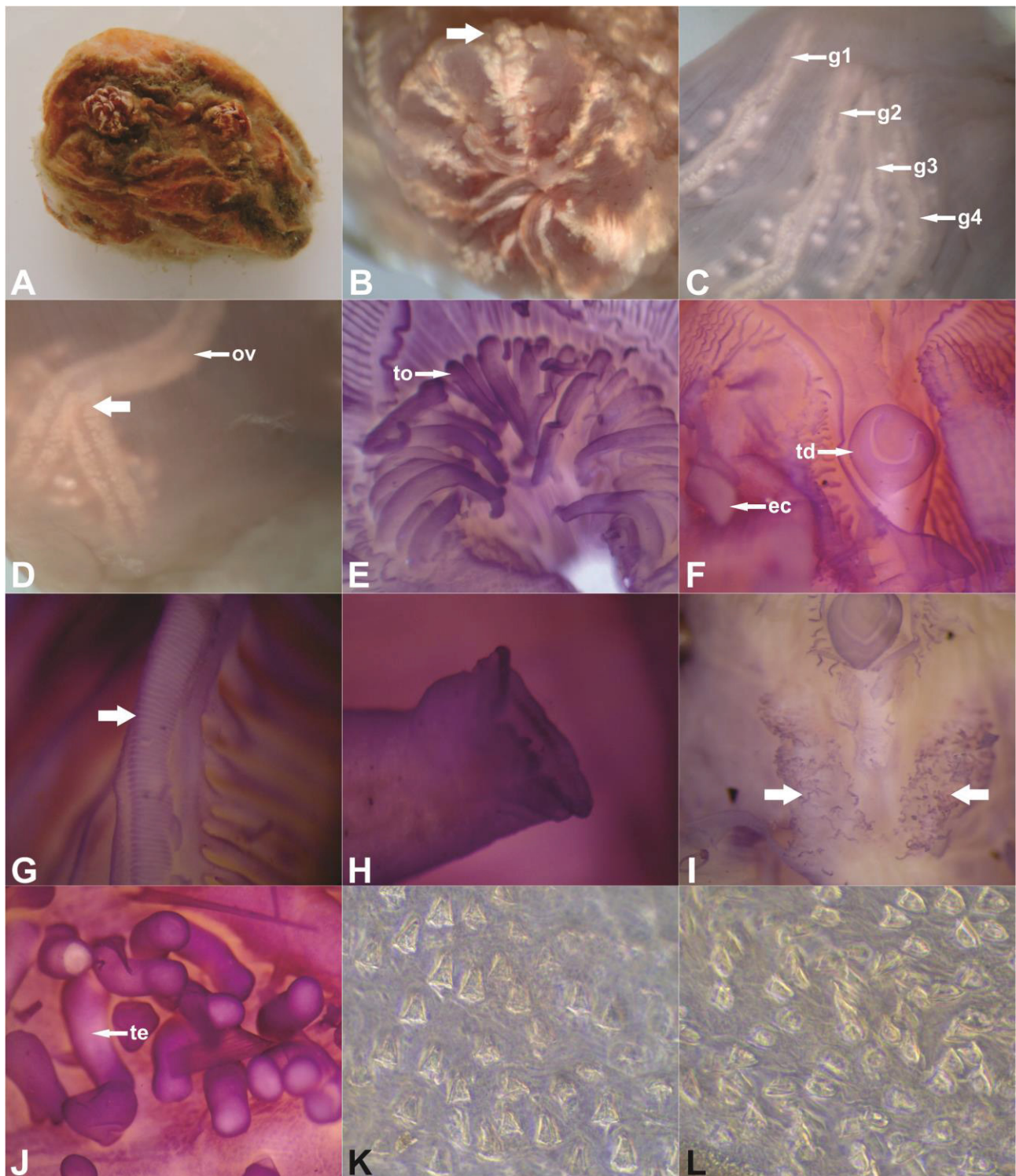
substrato artificial, Ilha San Cristóbal, Bocas del Toro, Panamá (9°21'0" N, 82°14'0" O), 12 de agosto de 2003.



**Figura 1.** Morfoespécie A *in situ*. Foto: Rosana M. da Rocha.

**Aparência externa.** Comprimento variando entre 22 e 38 mm. Formato ovalado, mais longo do que largo. Túnica coriácea de aspecto rugoso, com discretas projeções que se concentram na borda dos sifões (Fig. 2B). Coloração variando do marrom alaranjado até o marrom-avermelhado, sendo que a tonalidade se intensifica na região dorsal, próximo aos sifões. Poucos epibiontes, sendo algas filamentosas e poliquetas os grupos registrados (Fig. 1 e 2A).

**Morfologia interna.** Comprimento sem a túnica variando entre 14 e 34 mm, largura entre 9 e 16 mm. A parede do corpo é fina e translúcida, permitindo a visualização das gônadas e, algumas vezes, do tubo digestório. Os feixes musculares longitudinais são conspícuos na maioria dos casos. Os sifões estão próximos um do outro, sendo o oral apical e o atrial lateral e de comprimentos equivalentes, podendo ter mais de 7 mm nos espécimes maiores. Em cada sifão são observados quatro lobos triangulares e oito faixas esbranquiçadas. Entre 31 e 54 tentáculos simples e filiformes são observados na base do sifão oral, distribuídos em três ordens de tamanho (Fig. 2E). Pequenos e numerosos tentáculos filiformes estão presentes na base do sifão atrial, formando um anel de onde partem duas regiões também recobertas por tentáculos em direção ao tubérculo dorsal, aonde quase chegam (Fig. 2I). Pequenas escamas de natureza não calcária e formato triangular compõem o revestimento interno de ambos os sifões. A borda livre das escamas apresenta proeminências pouco desenvolvidas ou ausentes (Fig. 2K-L). O anel ciliado é formado por uma lâmina simples, com a área peritubercular em forma de 'V'. O tubérculo dorsal é globular, de diâmetro variando entre 0,25 e 0,88 mm e com a abertura de formato variável (Fig. 2F), normalmente em forma de 'U'.



**Figura. 2.** Morfoespécie A. **A.** Visão geral da túnica; **B.** Detalhe do sifão oral evidenciando as projeções na borda (seta); **C.** Exemplar com quatro gônadas do lado direito (setas); **D.** Bifurcação no ovário (seta); **E.** Visão geral dos tentáculos orais; **F.** Detalhe do tubérculo dorsal e da região peritubercular; **G.** Detalhe da rafe do estômago (seta); **H.** Detalhe da borda anal; **I.** Detalhe das projeções anteriores com tentáculos atriais (setas); **J.** Detalhe dos folículos testiculares digitiformes; **K-L.** Escamas sifonais.

Legenda: *g1-4.* gônadas; *ov.* ovário; *to.* tentáculos orais; *td.* tubérculo dorsal; *ec.* endocarpo; *te.* testículo.

A lâmina dorsal é simples, não subdividida e contínua até a região periesofágica, onde se desloca para o lado esquerdo da abertura do esôfago, tendo a porção inferior mais larga. A faringe

apresenta quatro pregas bem desenvolvidas em ambos os lados, com vasos longitudinais variando entre 58 e 111 no lado direito e 58 a 103 no lado esquerdo. Existem de 7 a 15 fendas longitudinais por malha. Vasos parastigmáticos estão presentes. A fórmula dos vasos longitudinais do holótipo e dos quatro parátipos segue abaixo:

E 5 (16) 6 (20) 5 (21) 5 (24) 9 LD 3 (23) 5 (20) 5 (21) 5 (16) 5 (Holótipo)

E 2 (9) 3 (14) 4 (12) 4 (13) 5 LD 1 (15) 3 (10) 4 (11) 4 (9) 2

E 6 (15) 8 (20) 9 (20) 8 (18) 8 LD 6 (17) 8 (16) 7 (17) 8 (14) 6

E 5 (14) 7 (19) 7 (18) 7 (14) 4 LD 5 (15) 8 (17) 8 (18) 6 (14) 7

E 5 (13) 5 (17) 5 (15) 5 (16) 4 LD 4 (18) 6 (16) 5 (17) 4 (14) 3

O esôfago é relativamente longo, discretamente curvado. Estômago alongado, entre 4,3 e 7,4 mm de comprimento, de coloração amarelo-alaranjado, com 19 a 28 pregas longitudinais internas. Na região mediana do estômago verifica-se uma região plana com estrias transversais (Fig. 2G). Observa-se um vaso sanguíneo entre a porção posterior do estômago e a primeira alça, mas não existe um ceco gástrico. O intestino é isodiamétrico e apresenta alças primária e secundária, sendo a alça secundária mais ampla que a primária. O ânus abre-se perto da base sifão atrial, com margem geralmente multilobada (Fig. 2H). O tubo digestório liga-se à parede do corpo através de vasos sanguíneos e desprende-se facilmente. Endocarpos de tamanhos e quantidades variáveis projetam-se da parede do corpo, nunca sobre as gônadas ou tubo digestório (Fig. 2F). Gônadas hermafroditas são observadas em ambos os lados, de duas a cinco do lado direito (Fig. 2C) e de duas a três do lado esquerdo. Ovário alongado, amarelo claro, de formato retilíneo a sinuoso e secção transversal cilíndrica, normalmente preenchido por vários ovócitos. O comprimento do ovário varia de 4,0 a 20,9 mm no lado direito e de 2,8 a 10,5 mm no lado esquerdo. Bifurcações nos tubos ovarianos podem estar presentes na porção distal de alguns ovários (Fig. 2D). Um dos ovários do lado esquerdo, geralmente mais curto, encontra-se parcialmente dentro da segunda alça intestinal. O diâmetro dos ovócitos varia entre 0,141 a 0,242 mm. Os folículos testiculares são esbranquiçados, distribuídos ao redor dos ovários, de formato digitiforme, às vezes globosos, com número de lobos variando de um a cinco por folículo (Figura 2J). Espermiduto comum reúne os ductos de muitos folículos testiculares e corre ao longo da superfície atrial de cada ovário para abrir-se perto do gonóporo do ovário.



## Morfoespécie B.

(Figuras 3 e 4)

**Material tipo.** Holótipo: ES07, substrato artificial, Iate Clube de Vitória, Espírito Santo, Brasil (20°17'56" S 40°17'23" O), 31 de março de 2017. Parátipos: ES08 e ES09, idem ao holótipo.



**Figura 3.** Morfoespécie B *in vivo* no laboratório. Foto: Rosana M. da Rocha.

**Aparência externa.** Comprimento variando entre 32 e 40 mm. Formato ovalado, mais longo do que largo. Túnica coriácea de aspecto rugoso e coloração marrom esverdeada, principalmente na região dorsal, próximo aos sifões (Fig. 3B). Alguns epibiontes observados, sendo ascídias coloniais, poliquetas tubícolas, antozoários e briozoários os grupos registrados (Fig. 3A).

**Morfologia interna.** Comprimento sem a túnica variando entre 28 e 29 mm, largura entre 15 e 18 mm. A parede do corpo é espessa e opaca, não permitindo a visualização das gônadas e do tubo digestório. Os feixes musculares longitudinais são conspícuos nos três exemplares. Os sifões estão próximos um do outro, sendo o oral apical e o atrial lateral, de comprimentos equivalentes, podendo chegar a quase 5 mm. Em cada sifão são observados quatro lobos triangulares e oito faixas esbranquiçadas. Entre 32 e 62 tentáculos simples e filiformes são observados na base do sifão oral, distribuídos em três ordens de tamanho (Fig. 3E). Pequenos e numerosos tentáculos filiformes estão presentes na base do sifão atrial, formando um anel de onde partem duas regiões alongadas recobertas por tentáculos em direção ao tubérculo dorsal. Pequenas escamas de natureza não calcária e formato triangular compõem o revestimento interno de ambos os sifões. A borda livre das escamas apresenta proeminências pouco desenvolvidas ou ausentes e aspecto serrilhado (Fig. 3I). O anel ciliado é formado por uma lâmina simples, com a área peritubercular em forma de 'V'. O tubérculo dorsal é globular, de diâmetro variando entre 0,77 e 1,3 mm e com a abertura de formato variável (Fig. 3F), normalmente em forma de 'U'. A lâmina dorsal é simples, não subdividida e

continua até a região periesofágica, onde se desloca para o lado esquerdo da abertura do esôfago, tendo a porção inferior mais larga. A faringe apresenta quatro pregas bem desenvolvidas em ambos os lados, com vasos longitudinais variando de 94 a 103 no lado direito e de 94 a 101 no lado esquerdo. Existem de 7 a 12 fendas longitudinais por malha. Vasos parastigmáticos estão presentes. A fórmula dos vasos longitudinais do holótipo e dos dois parátipos segue abaixo:

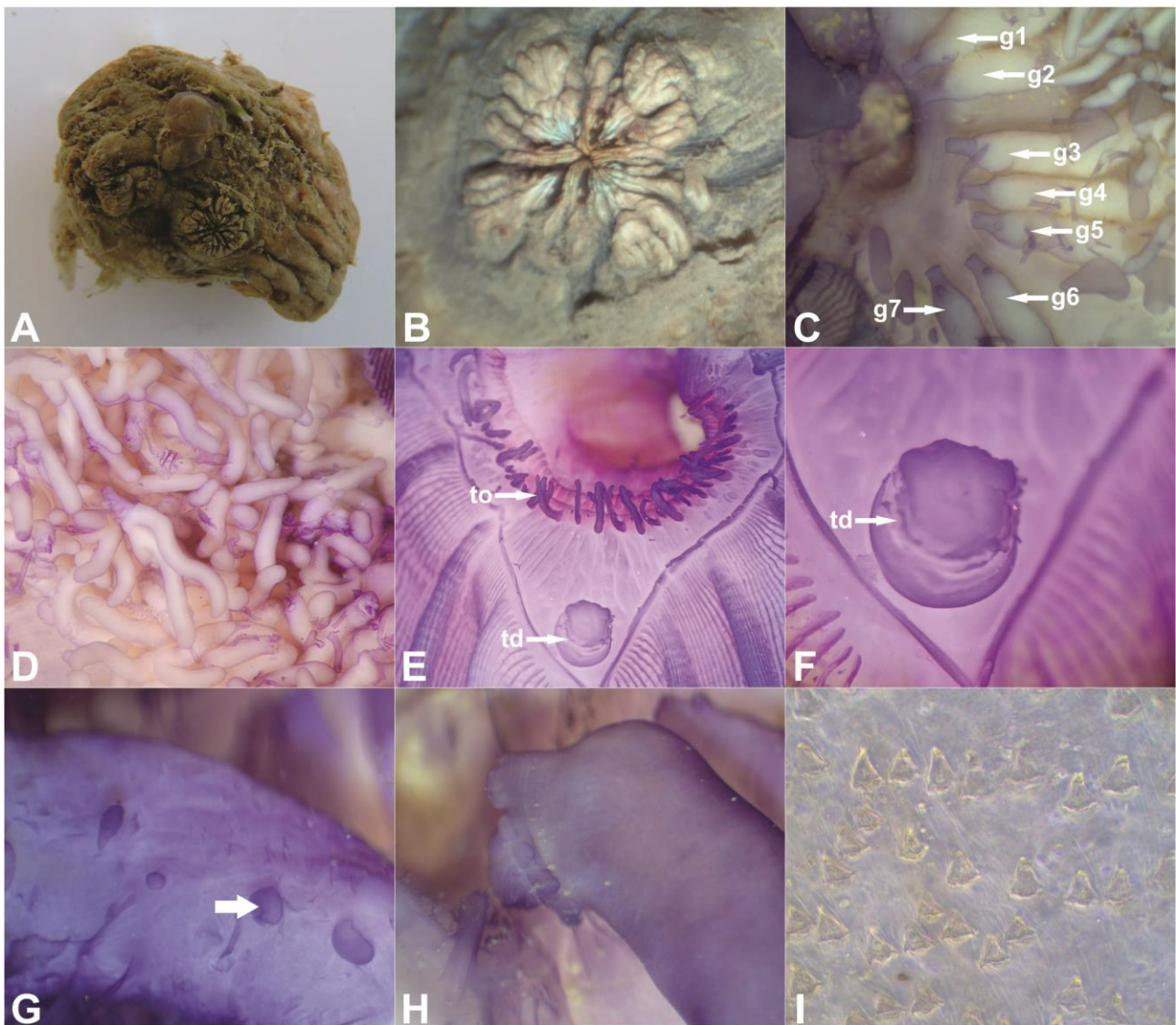
E 6 (14) 9 (17) 8 (19) 7 (17) 6 LD 4 (18) 7 (17) 7 (19) 8 (15) 6 (Holótipo)

E 6 (12) 7 (15) 8 (14) 8 (17) 7 LD 5 (15) 9 (14) 9 (15) 8 (13) 6

E 6 (14) 8 (19) 6 (16) 7 (16) 8 LD 4 (15) 8 (15) 8 (18) 7 (15) 5

O esôfago é relativamente curto, discretamente curvado. Estômago alongado, entre 11,9 e 14,3 mm de comprimento, de coloração creme, com 22 a 23 pregas longitudinais internas. Na região mediana do estômago verifica-se uma região plana com estrias transversais. Observa-se um vaso sanguíneo entre a porção posterior do estômago e a primeira alça, mas não existe um ceco gástrico. O intestino é isodiamétrico e apresenta alças primária e secundária, sendo a alça secundária mais ampla que a primária. O ânus abre-se perto da base sifão atrial, com margem geralmente multilobada (Fig. 3H). O tubo digestório liga-se à parede do corpo através de vasos sanguíneos e desprende-se facilmente. Endocarpos de tamanhos e quantidades variáveis projetam-se da parede do corpo e também da segunda alça intestinal (Fig. 3G).

Gônadas hermafroditas são observadas em ambos os lados, de cinco a oito do lado direito (Fig. 3C) e de quatro a cinco do lado esquerdo. Ovário alongado, creme, de formato retilíneo a sinuoso e secção transversal cilíndrica, normalmente preenchido por vários ovócitos. O comprimento do ovário varia de 9,5 a 17,6 mm no lado direito e de 7,6 a 14,3 mm no lado esquerdo. Bifurcações nos tubos ovarianos podem estar presentes na porção mediana de alguns ovários. De um a três ovários do lado esquerdo, geralmente mais curtos, encontram-se totalmente dentro da segunda alça intestinal. O diâmetro dos ovócitos varia entre 0,218 a 0,228 mm. Os folículos testiculares são numerosos, esbranquiçados e distribuídos ao redor dos ovários. Apresentam formato digitiforme e são mais longos do que o usual, com número de lobos variando de um a quatro por folículo (Fig. 3D). Espermiduto comum reúne os ductos de muitos folículos testiculares e corre ao longo da superfície atrial de cada ovário para abrir-se perto do gonópore do ovário.



**Figura 3.** Morfoespécie B. **A.** Visão geral da túnica; **B.** Detalhe do sifão atrial evidenciando pigmentação esverdeada (seta); **C.** Exemplar com sete gônadas do lado direito (setas); **D.** Folículos testiculares; **E.** Visão geral dos tentáculos orais; **F.** Detalhe do tubérculo dorsal e da região peritubercular; **G.** Endocarpos sobre a segunda alça intestinal (seta); **H.** Detalhe da borda anal; **I.** Escamas sifonais.

Legenda: *g1-7.* gônadas; *to.* tentáculos orais; *td.* tubérculo dorsal.

## DISCUSSÃO

As morfoespécies descritas são similares a *Styela canopus* (Savigny, 1816) com relação ao padrão morfológico geral, que inclui: formato ovalado, sifão oral apical e sifão atrial lateral, quatro lobos em ambos os sifões com faixas pigmentares brancas entre e sobre os lobos, ânus frequentemente multilobado e abertura do tubérculo dorsal em forma de ‘U’. No entanto, a morfoespécie A apresentou, na maioria dos espécimes analisados, mais do que duas gônadas do lado direito e a morfoespécie B apresentou um número maior do que quatro de gônadas em ambos os lados em todos os espécimes. O padrão de gônadas aceito para *S. canopus* é de uma a duas



gônadas de cada lado (Cap. II) e a descrição original não prevê a possibilidade de mais de quatro gônadas (SAVIGNY, 1816).

A grande maioria das espécies de *Styela* apresenta apenas uma ou duas gônadas de cada lado do corpo. São exceções conhecidas, *Styela adriatica* Monniot F. & Monniot C., 1975; *Styela maeandria* Sluiter, 1904; *Styela plicata* (Lesueur, 1823), *Styela thalassae* Monniot C., 1969 e *Styela clava* Herdman, 1881 (Tab. 1). Em *S. adriatica* foram observadas quatro gônadas do lado direito e três do lado esquerdo (MONNIOT & MONNIOT, 1975), variação semelhante à verificada na morfoespécie A. Por outro lado, *S. adriatica* é uma espécie de águas profundas que apresenta tentáculos atriais ramificados, pequeno número de vasos longitudinais na faringe, ovários às vezes bifurcados na porção proximal e testículos agregados em massas globosas muito próximas das paredes dos ovários (MONNIOT & MONNIOT, 1975), o que a difere de ambas as espécies aqui descritas.

Embora similar na variação do número de gônadas em ambos os lados e pela bifurcação posterior de alguns ovários (ABBOTT & JOHNSON, 1972), a morfoespécie B difere de *Styela clava* em função da localização dos sifões que, em *S. clava* ficam juntos na região apical, pelo formato alongado do corpo e pela presença de um conspícuo pedúnculo (HERDMAN, 1881). *Styela maeandria* difere da morfoespécie A pelo maior número de gônadas (VAN NAME, 1918) e difere de ambas as espécies aqui descritas pela ausência de endocarpos (SLUITER, 1904) e pelo número reduzido de fendas por malha. *Styela plicata* é sensivelmente diferente da morfoespécie A, tanto pelo tamanho do corpo quanto pelo número de gônadas. Tokioka (1953b) relatou entre três e nove gônadas do lado direito e de uma a três do lado esquerdo em espécimes de *S. plicata* coletados no Japão. Tucker (1942) registrou de 2 a 11 gônadas do lado direito em indivíduos amostrados na Carolina do Norte (EUA). *Styela plicata* também difere da morfoespécie B devido à morfologia dos folículos testiculares que na morfoespécie B são mais longos e numerosos.

**Tabela 1.** Comparação entre as espécies de *Styela* com mais de quatro gônadas.

Espécies	CC	TO	Gd	Ge	FM	PLE	VLe	PS	BA
Morfoespécie A	22-38	31-54	2-5	2-3	7-15	19-28	34-125	S	M
Morfoespécie B	32-40	32-62	5-8	4-5	7-12	22-23	94-101	S	M
<i>Styela adriatica</i>	3	17	4	3	-	12	15-23	S	B
<i>Styela clava</i> <sup>1</sup>	17-50	30	4-9	2-5	6	25-30	84	J	?
<i>Styela maeandria</i>	31-42	80	6	4	2-7	-	134	S	M
<i>Styela plicata</i>	18-95	30-83	2-11	1-4	6-10	19-36	70-125	S	M
<i>Styela thalassae</i>	25	22	2-7	2-5	1-5	20	144	J	M

Legenda: CC. Comprimento do corpo sem a túnica (mm); TO. Número de tentáculos orais; Gd/Ge. Número de gônadas dos lados direito e esquerdo; FM. Número de fendas por malha. PLE. Número de pregas longitudinais no estômago; VLe. Número de vasos longitudinais do lado esquerdo; PS. Posição dos sifões; BA. Formato da borda anal; S. Separados; J. Juntos; B. Bilobado; M. Multilobado. <sup>1</sup>sem o pedúnculo.

*Styela thalassae*, também uma espécie de águas profundas (350 m), distingue-se das novas espécies em função da morfologia dos folículos testiculares que estão dispostos em duas massas distintas e que não parecem estar particularmente relacionados a nenhum ovário (MONNIOT, 1969b), nada similares aos folículos digitiformes observados. Além disso, a bifurcação do ovário, quando presente, ocorre na região proximal do mesmo.

Até o presente momento apenas *Styela squamosa* Herdman, 1881 e *Styela canopus* haviam sido registradas em águas panamenhas (VAN NAME, 1945; CARMAN *et al.*, 2011). A primeira é uma espécie de águas profundas, enquanto *S. canopus* foi encontrada em marinas. Ambas as espécies registradas no lado pacífico do Panamá. Os registros prévios de *S. canopus* e *S. plicata* para a região de Bocas del Toro (ROCHA *et al.*, 2005a) estão incorretos e tratam-se da morfoespécie A descrita neste trabalho, bem como o registro de *S. canopus* para a Ilha Margarita, Venezuela (ROCHA *et al.*, 2010). Os demais registros de *S. canopus* no Caribe (listados em ROCHA *et al.*, 2005a) deverão ser revisados para uma compreensão mais adequada da real extensão geográfica dessa espécie e da morfoespécie A.

*Styela plicata* era a única espécie conhecida para o litoral do Espírito Santo (WIRTZ *et al.*, 2009; GAMBA, 2013) até o momento, tendo sido encontrada em ambientes antropizados e substrato artificial, pois se trata de uma espécie introduzida no Brasil. Apesar do extenso levantamento realizado em substratos naturais na região (LOTUFO, 2002; GAMBA, 2013) e em mergulhos mais recentes, a morfoespécie B foi encontrada unicamente como um agregado aderido a uma corda no Iate Clube de Vitória o que sugere que também se trata de uma nova introdução na costa brasileira.

## CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho destaca a importância de uma abordagem combinada para o estudo da diversidade de ascídias nos mares e oceanos do planeta. A análise conjunta de dados moleculares, morfológicos e de distribuição geográfica apontou para a existência de especiação incipiente, permitindo a conclusão de que *Styela canopus* é um complexo de espécies crípticas. Resta ainda muito por conhecer sobre as espécies que compõem o gênero *Styela*. Este estudo demonstra isto.

Os dados moleculares revelaram a assinatura evolutiva de linhagens geneticamente independentes no complexo *Styela canopus*. Com o auxílio de metodologias de delineamento de espécies, apresentamos evidências indicativas de que eventos passados levaram ao isolamento reprodutivo de algumas populações do complexo *Styela canopus*. No entanto, fatores contemporâneos como o transporte marítimo também estão influenciando o processo evolutivo, alterando a distribuição dos organismos e, possivelmente, interferindo na dinâmica populacional. Os dados moleculares deste estudo podem pautar estudos futuros sobre a investigação de novas espécies no complexo *Styela canopus*.

Os dados morfométricos não se mostraram muito eficazes para o estabelecimento de espécies dentro do complexo *Styela canopus* devido ao elevado grau de homoplasias. Por outro lado, foi possível estabelecer alguns caracteres qualitativos com potencial diagnóstico e, com esses, identificar e descrever duas novas espécies para o gênero *Styela*.

A identificação correta das espécies é essencial para qualquer estudo biologicamente significativo. Sem o reconhecimento adequado da espécie, outros aspectos referentes à sua biologia perdem relevância. A descoberta de um elevado número de espécies crípticas aponta para um cenário onde o processo de especiação é mais comum do que se imaginava e reforça a importância das taxonomias morfológica e molecular, tanto para a melhor compreensão da evolução da vida, quanto para a efetiva conservação da biodiversidade.

*If you do not know the names of things, the knowledge of them is lost, too.*



## REFERÊNCIAS

## A

- ABBOTT, D.P.; JOHNSON, J.V. The ascidians *Styela barnharti*, *S. plicata* and *S. montereyensis* in californian waters. **Bulletin of the Southern California Academy of Sciences**, v. 71 n. 2, p. 95-105. 1972.
- ABBOTT, D.P.; NEWBERRY, A.T.; MORRIS, K.M. **Reef and Shore Fauna of Hawaii**. Section B: Ascidians (Urochordata). Honolulu: Bishop Museum Press, 1997. 64p.
- ABBOTT, R.; ALBACH, D.; ANSELL, S.; ARNTZEN, J.W.; BAIRD, S.J.E.; BIERNE, N.; BOUGHMAN, J.; BRELSFORD, A.; BUERKLE, C.A.; BUGGS, R.; BUTLIN, R.K.; DIECKMANN, U.; EROUKHMANOFF, F.; GRILL, A.; CAHAN, S.H.; HERMANSEN, J.S.; HEWITT, G.; HUDSON, A.G.; JIGGINS, C.; JONES, J.; KELLER, B.; MARCZEWSKI, T.; MALLET, J.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, P.; MÖST, M.; MULLEN, S.; NICHOLS, R.; NOLTE, A.W.; PARISOD, C.; PFENNIG, K.; RICE, A.M.; RITCHIE, M.G.; SEIFERT, B.; SMADJA, C.M.; STELKENS, R.; SZYMURA, J.M.; VÄINÖLÄ, R.; WOLF, J.B.W.; ZINNER, D. Hybridization and speciation. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 26, p. 229-246. 2013.
- ABDUL, J.A.H.; SIVAKUMAR, V. Occurrence and distribution of ascidians in Vizhinjam Bay (south west coast of India). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 342, p. 189-190. 2007.
- AGAPOW, P.M.; BININDA-EMONDS, O.R.P.; CRANDALL, K.A.; GITTLEMAN, J.L.; MACE, G.M.; MARSHALL, J.C.; PURVIS, A. The impact of species concept on biodiversity studies. **The Quarterly Review of Biology**, v. 79, n. 2, p. 161-179. 2004.
- AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, v. 19, n. 6, p. 716-723. 1974.
- ALDER, J.; HANCOCK, A. **The British Tunicata, An Unfinished Monograph**. Volume II. London, The Ray Society. 1907. 164p.
- ALI, H.A.J.; TAMILSELVI, M. **Ascidians in Coastal Water - A Comprehensive Inventory of Ascidian Fauna from the Indian Coast**. Switzerland. Springer International Publishing. 2016. 157p.
- ALLEE, W.C. Studies in Marine Ecology: I. The Distribution of Common Littoral Invertebrates of the Woods Hole Region. **Biological Bulletin**, v. 44, n. 4, p. 167-191. 1923.
- ANIL, A.C.; VENKAT, K.; SAWANT, S.S.; DILEEPKUMAR, M.; DHARGALKAR, V.K.; RAMAIAH, N.; HARKANTRA, S.N.; ANSARI, Z.A. Marine bioinvasion: Concern for ecology and shipping. **Current Science**, v. 83, n. 3, p. 214-218. 2002.
- ANTONIADOU, C.; GEROVASILEIOU, V.; BAILLY, N. Ascidiacea (Chordata: Tunicata) of Greece: an updated checklist. **Biodiversity Data Journal**, v. 4, e9273. 2016.
- APPELTANS, W. *et al.* The Magnitude of Global Marine Species Diversity. **Current Biology**, v. 22, p. 2189-2202. 2012.
- ARON, S.; SOLÉ-CAVA, A. Genetic Evaluation of the Taxonomic Status of Two Varieties of the Cosmopolitan Ascidian *Botryllus niger* (Ascidaceae: Botryllidae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 19, n. 4, p. 271-276. 1991.
- AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 489-522. 1987.
- AVISE, J.C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36, p. 3-15. 2009.

## B

- BARRACLOUGH, T.G.; NEE, S. Phylogenetics and speciation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 7, 391-399. 2001.
- BARTON, N.H.; CHARLESWORTH, B. Genetics revolution, founder effects, and speciation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 15, p. 133-64. 1984.
- BEATTLE, A.J.; OLIVER, I. Taxonomic minimalism. **TREE**, v. 9, n. 12, p. 488-490. 1994.
- BEHEREGARAY, L.B.; CACCONI, A. Cryptic biodiversity in a changing world. **Journal of Biology**, v. 6, p. 1-5. 2007.
- BENSASSON, D.; ZHANG, D.X.; HARTL, D.L.; HEWITT, G.M. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 6, p. 314-321. 2001.
- BERRIL, N.J. Ascidians of the Bermudes. **Biological Bulletin**, v. 62, n. 1, p. 77-88. 1932.
- BERRIL, N.J. **The Tunicata**. With an account of the British Species. London, The Ray Society. 1950. 267p.
- BICKFORD, D.; LOHMAN, D.J.; SODHI, N.S.; NG, P.K.L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K.K.; DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 22, n. 30, p. 148-155. 2006.
- BLAGOEV, A.G.; DEWAARD, J.R.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, S.L.; LU, L.I.; ROBERTSON, J.; TELFER, A.C.; HEBERT, P.D.N. **Molecular Ecology Resources**, v. 16, p. 325-341. 2016.
- BOCK, D.G.; MACISAAC, H.J.; CRISTESCU, M.E. Multilocus genetic analyses differentiate between widespread and spatially restricted cryptic species in a model ascidian. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, p. 2377-2385. 2012.
- BOEGER, W.A.; PIE, M.R.; FALLEIROS, R.M.; OSTRENSKY, A.; DARRIGRAN, G.; MANSUR, M.C.D.; BELZ, C.E. Testing a molecular protocol to monitor the presence of golden mussel larvae (*Limnoperna fortunei*) in plankton samples. **Journal of Plankton Research**, v. 29, n. 11, p. 1015-1019. 2007.
- BORKIN, L.J.; LITVINCHUK, S.N.; ROSANOV, Y.M.; SKORINOV, D.V. On Cryptic Species (an Example of Amphibians). **Translated from Zoologicheskii Zhurnal**, v. 84, n. 8, p.75-98. 2004.
- BOUCKAERT, R.; HELED, J.; KÜHNERT, D.; VAUGHAN, T.; WU, CH.; XIE, D.; SUCHARD, M.C.; RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A.J. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. **PLoS Computacional Biology**, v. 10, n. 4, e1003537. 2014.
- BOUZON, J.L.; VARGAS, S.M.; OLIVEIRA NETO, J.F.; STOCO, P.H.; BRANDINI, F.P. Cryptic species and genetic structure in *Didemnum granulatum* Tokioka, 1954 (Tunicata: Ascidiacea) from the southern Brazilian coast. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 4, p. 923-932. 2014.
- BREMER, K. The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. **Evolution**, v. 42, p. 795-803. 1988.
- BREWIN, B.I. Ascidians of the Hauraki Gulf. Part I. **Transactions of the Royal Society of New Zealand**, v. 77, n. 1, p.115-138. 1948.
- BROWN, W.M.; GEORGE, M.; WILSON, A.C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 76, p. 1967-1971. 1979.
- BRUNETTI, R.; GISSI, C.; PENNATI, R.; CAICCI, F.; GASPARINI, F.; MANNI, L. Morphological evidence that the molecularly determined *Ciona intestinalis* type A and type B are different species: *Ciona robusta* and *Ciona intestinalis*. **Journal of Zoological Systematics and Evolution Research**, v. 53, n. 3, p. 186-193. 2015.
- BUSH, G.L. Modes of animal speciation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 6, p. 339-364. 1975.



BUSH, G.L. Sympatric speciation in animals: new wine in old bottles. **TREE**, v. 9, n. 8, p. 285-288. 1994.

## C

- CANNING-CLODE, J.; FOFONOFF, P.; MCCANN, L.; CARLTON, J.T.; RUIZ, G. Marine invasions on a subtropical island: fouling studies and new records in a recent marina on Madeira Island (Eastern Atlantic Ocean). **Aquatic Invasions**, v. 8, n. 3, p. 261-270. 2013.
- CARABALLO-PÉRES, V.; DÍAZ, O.D. Ascidiaceae (Tunicata: Ascidiacea) del Golfo de Cariaco, Venezuela. **Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela**, v. 50, n. 2, p. 233-244. 2011.
- CARMAN, M.R.; BULLARD, S.G.; ROCHA, R.M.; LAMBERT, G.; DIJKSTRA, J.A.; ROPER, J.J.; GOODWIN, A.; CARMAN, M.M.; VAIL, E.M. Ascidiaceae at the Pacific and Atlantic entrances to the Panama Canal. **Aquatic Invasions**, v. 6, n. 4, p. 371-380. 2011.
- CARSTENS, B.C.; PELLETIER, T.A.; REID, N.M.; SATLER, J.D. How to fail at species delimitation. **Molecular Ecology**, v. 22, p. 4369-4383. 2013.
- CASTELLANO, S.; BALLETO, E. Is the partial Mantel Test inadequate? **Evolution**, v. 56, n. 9, p. 1871-1873. 2002.
- CHOI, S.C. Methods for delimiting species via population genetics and phylogenetics using genotype data. **Genes & Genomics**, v. 38, p. 905-915. 2016.
- CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K.A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1657-1659. 2000.
- CLEMENT, M.; SNELL, Q.; WALKER, P.; POSADA, D.; CRANDALL, K.. TCS: Estimating gene genealogies. **Parallel and Distributed Processing Symposium, International Proceedings**, v. 2, p. 184. 2002.
- COOK, L.G.; EDWARDS, R.D.; CRISP, M.D.; HARDY, N.B. Need morphology always be required for new species descriptions? **Invertebrate Systematics**, v. 24, p. 322-326. 2010.
- COPENHAVER, M.D.; HOLLAND, B. Computation of the distribution of the maximum studentized range statistic with application to multiple significance testing of simple effects. **Journal of Statistical Computation and Simulation**, v. 30, p. 1-15. 1988.
- COSTA, H.R. Notas sobre os Ascidiacea brasileiros. Parte VI. **Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro**, v. 12, n. 5-6, p. 321-325. 1969.
- CRACRAF, J. Species Concepts and Speciation Analysis. **Current Ornithology**, v. 1, p. 159-187. 1983.
- CRISPO, E.; MOORE, J.-S.; LEE-YAW, J.A.; GRAY, S.M.; HALLER, B.C. Broken barriers: Human-induced changes to gene flow and introgression in animals. **Bioessays**, v. 33, p. 508-518. 2011.

## D

- DANQING, F.; YING, H.; CAIHUAN, K.E.; SHIQIANG, Z.; SHAOJING, L. Settlement and metamorphosis of *Styela canopus* Savigny larvae in response to some neurotransmitters and thyroxine. **Acta Oceanologica Sinica**, v. 25, n. 3, p. 90-97. 2006.
- DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772. 2012.
- DALBY, J.E.JR. Reproductive and electrophoretic evidence for genetic maintenance of dimorphism in the ascidian *Pyura stolonifera* near Melbourne, Australia. **Ophelia**, v. 47, p. 227-243. 1997.
- DEGNAN, B. M.; M. F. LAVIN. Highly repetitive DNA sequences provide evidence for a lack of gene flow between two morphological forms of *Herdmania momus* (Ascidiacea: Stolidobranchia). **Marine Biology**, v. 124, p. 293-299. 1995.
- DE QUEIROZ, K. Species Concepts and Species Delimitation. **Systematic Biology**, v. 56, n. 6, p. 879-886. 2007.



- DI BELLA, M.A.; CASSAR, G.; RUSSO, D.; DE LEO, G. Cellular components and tunic architecture of the solitary ascidian *Styela canopus* (Stolidobranchiata, Styelidae). **Tissue & Cell**, v. 30, n. 3, p. 352-359. 1998.
- DI BELLA, M.A.; DE LEO, G. Microscopic features of the tunic in young *Styela canopus* (Tunicata, Styelidae). In: MÉNDEZ-VILAS, A. (ed.) **Microscopy: advances in scientific research and education**, v. 1. Formatex Research Center. 2014. 588p.
- DISNEY, H. Rescue plan needed for taxonomy. **Nature**, v. 394, p. 120. 1998.
- DISNEY, H. Hands-on taxonomy. **Nature**, v. 405, p. 619. 2000.
- DOBZHANSKY, T. **Genetics and the Origin of Species**, 3 ed. New York: Columbia University Press. 1951. 360p.
- DOMINGOS, F.M.C.B.; GUARINO, R.C.; LEMMON, A.; LEMMON, E.M.; BEHEREGARAY, L.B. In the shadows: Phylogenomics and coalescent species delimitation unveil cryptic diversity in a Cerrado endemic lizard (Squamata: *Tropidurus*). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 107, p. 455-465. 2017.
- DRAKE, J.M.; LODGE, D.M. Global hot spots of biological invasions: evaluating options for ballast-water management. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 271, p. 575-580. 2004.
- DRAKE, J.M.; LODGE, D.M. Hull fouling is a risk factor for intercontinental species exchange in aquatic ecosystems. **Aquatic Invasions**, v. 2, n. 2, p. 121-131. 2007.

## E

- EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797. 2004.
- ENDLER, J.A. **Geographic variation, speciation, and clines**. New Jersey: Princeton University Press, 1977. 244p.
- ERMAK, T.H. Cell Proliferation in the Digestive Tract of *Styela clava* (Urochordata: Ascidiacea) as Revealed by Autoradiography with Tritiated Thymidine. **Journal of Experimental Zoology**, v. 194, p. 44-66. 1975.
- ERMAK, T.H. A Comparison of Cell Proliferation Patterns in the Digestive Tract of Ascidians. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 217, p. 325-339. 1981.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. ARLEQUIN version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolution and Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50. 2005.

## F

- FARRIS, J.S. Methods for Computing Wagner Trees. **Systematic Zoology**, v. 19, n. 1, p. 83-92. 1970.
- FARRIS, J.S. The retention index and the rescaled consistency index. **Cladistics**, v. 5, p. 417-419. 1989.
- FEHLAUER-ALE, K.H.; MACKIE, J.A.; LIM-FONG, G.E.; ALE, E.; PIE, M.R.; WAESCHENBACH, A. Cryptic species in the cosmopolitan *Bugula neritina* complex (Bryozoa, Cheilostomata). **Zoologica Scripta**, v. 43, n. 2, p. 193-205. 2014.
- FELSENSTEIN, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791. 1985.
- FENG, D.; KE, C.; LU, C.; LI, S. The influence of temperature and light on larval pre-settlement metamorphosis: a study of the effects of environmental factors on pre-settlement metamorphosis of the solitary ascidian *Styela canopus*. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 43, n. 1, p. 1-14. 2010.

- FERNANDEZ, G.C.J. Residual Analysis and Data Transformations: Important Tools in Statistical Analysis. **Hort Science**, v. 27, n. 4, p. 297-300, 1992.
- FERRER, J.; WINGERT, J.M.; MALABARRA, L.R. Description of a new species and phylogenetic analysis of the subtribe Cynopoecilina, including continuous characters without discretization (Cyprinodontiformes: Rivulidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 172, p. 846-866. 2014.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294-299. 1994.
- FUJISAWA, T.; BARRACLOUGH, T.G. Delimiting Species Using Single-Locus Data and the Generalized Mixed Yule Coalescent Approach: A Revised Method and Evaluation on Simulated Data Sets. **Systematic Biology**, v. 62, n. 5, p. 707-724. 2013.

## G

- GAMBA, G.A. **Ascídias (Tunicata, Ascidiacea) do Espírito Santo, Brasil**. 168 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.
- GARRICK, R.C.; SUNNUCKS, P.; DYER, R.J. Nuclear gene phylogeography using PHASE: dealing with unresolved genotypes, lost alleles, and systematic bias in parameter estimation. **Evolutionary Biology**, v. 10, n. 118, p. 1-17. 2010.
- GAVRILETS, S.; HASTINGS, A. Founder effect speciation: a theoretical reassessment. **The American Naturalist**, v. 147, n. 3, p. 466-491. 1996.
- GELLER, J.B.; WALTON, E.D.; GROSHOLZ, E.D.; RUIZ, G.M. Cryptic invasions of the crab *Carcinus* detected by molecular phylogeography. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 901-906. 1997.
- GEWING, M.T.; BRONSTEIN, O.; NAGAR, L.R.; GRANOT, I.; FRID, O.; SHENKAR, N. First record of the non-indigenous ascidian *Microcosmus exasperatus*, Heller 1878, in Cyprus. **Marine Biodiversity**, v. 46, p. 937-941. 2016.
- GEWING, M.T.; SHENKAR, N. Monitoring the magnitude of marine vessel infestation by non-indigenous ascidians in the Mediterranean. **Marine Pollution Bulletin**, v. 121, n. 1-2, p. 52-59. 2017.
- GHOBASHY, A.F.A.; EL KOMY, M.M. Fouling in Lake Timsah (Egypt) **Hydrobiological Bulletin**, v. 14, n. 3, p. 169-178. 1980.
- GHOBASHY, A.F.A.; MESSEIH, M.K.A. Ascidians in egyptian waters. **Journal of Egyptian German Society Zoology**, v. 4, p. 313-326. 1991.
- GOLDSTEIN, P.Z.; DESALLE, R. Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: Determination, discovery, and description. **Bioessays**, v. 33, p. 135-147. 2010.
- GOLOBOFF, P.A. Analyzing Large Data Sets in Reasonable Times: Solutions for Composite Optima. **Cladistics**, v. 15, p. 415-428. 1999.
- GOLOBOFF, P.A.; MATTONI, C.I.; QUINTEROS, A.S. Continuous characters analyzed as such. **Cladistics**, v. 22, p. 589-601. 2006.
- GOLOBOFF, P.A.; FARRIS, J.S.; NIXON, K.C. TNT, a free program for phylogenetic analysis. **Cladistics**, v. 24, p. 1-13. 2008.
- GOLOBOFF, P.A.; CATALANO, S.A. TNT version 1.5, including a full implementation of phylogenetic morphometrics. **Cladistics**, v. 32, p. 221-238. 2016.
- GOLUBCHIK, T.; WISE, M.; EASTEAL, S.; JERMIIN, L.S. Mind the gaps: evidence of bias in estimates of multiple sequence alignments. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 2433-2442. 2007.
- GONZÁLEZ-WANGÜEMERT, M.; VERGARA-CHEN, C. Environmental variables, habitat discontinuity and life history shaping the genetic structure of *Pomatoschistus marmoratus*. **Helgoland Marine Research**, v. 68, p. 357-371. 2014.

- GONZÁLES-WANGÜEMERT, M.; VALENTE, S.; AYDIN, M. Effects of fishery protection on biometry and genetic structure of two target sea cucumber species from the Mediterranean Sea. **Hydrobiologia**, v. 743, p. 65-74. 2015.
- GOODALL-COPESTAKE, W.P.; TARLING, G.A.; MURPHY, E.J. On the comparison of population-level estimates of haplotype and nucleotide diversity: a case study using the gene *cox1* in animals. **Heredity**, v. 109, p. 50-56. 2012.
- GOODBODY, I. Ascidiens from Caribbean shallow water localities. **Studies on the Fauna of Curaçao and other Caribbean Islands**, v. 68, p. 62-76. 1984a.
- GOODBODY, I. The ascidian fauna of two contrasting lagoons in the Netherlands Antilles: Piscadera Baai, Curaçao, and the Lac of Bonaire. **Studies on the Fauna of Curaçao and other Caribbean Islands**, v. 202, p. 21-61. 1984b.
- GOODBODY, I. Diversity and distribution of ascidians (Tunicata) in the Pelican Cays, Belize. **Atoll Research Bulletin**, v. 480, p. 302-326. 2000.
- GOODBODY, I. The ascidian fauna of Port Royal, Jamaica I. Harbor and mangrove dwelling species. **Bulletin of Marine Science**, v. 73, n. 2, p. 457-476. 2003.
- GRANOT, I.; SHENKAR, N.; BELMAKER, J. Habitat niche breadth predicts invasiveness in solitary ascidians. **Ecology and Evolution**, v. 7, p. 7838-7847. 2017.
- GRANTHOM-COSTA, L.V.; FERREIRA, C.G.W.; DIAS, G.M. Biodiversity of ascidians from southeastern Brazil. **Management of Biological Invasions**, v. 7, n. 1, p. 5-12. 2016.
- GRIGGIO, F.; VOSKOBOYNIK, A.; IANNELLI, F.; JUSTY, F.; TILAK, M-K.; TURON, X.; PESOLE, G.; DOUZERY, E.J.P.; MASTROTOTARO, F.; GISSI, C. Ascidian mitogenomics: comparison of evolutionary rates in closely related taxa provides evidence of ongoing speciation events. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, p. 591-605. 2014.
- GUERRA-CASTRO, E.; CRUZ-MOTTA, J.J.; CONDE, J.E. Cuantificación de la diversidad de especies incrustantes asociadas a las raíces de *Rhizophora mangle* L. em el Parque Nacional Laguna de La Restinga. **Interciencia**, v. 36, n. 12, p. 923-930. 2011.

## H

- HALIM, Y.; MESSEIH, M.A. Aliens in Egyptian waters. A checklist of ascidians of the Suez Canal and the adjacent Mediterranean waters. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 42, p. 449-457. 2016.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98. 1999.
- HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. **Paleontological Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1-9. 2001.
- HARANT, H. Ascidiens récoltées au cours des campagnes scientifiques de S.A.S. le Prince Albert Ier de Monaco. **Bulletin de L'Institut Océanographique**, v. 467, p. 465-468. 1925.
- HARANT, H. Introduction synoptique à une faune de France des Tuniciers. I - Ascidiens Stolidobranchiates. **Bulletin de L'Institut Océanographique**, v. 508, p. 1-10. 1927a.
- HARANT, H. Rapport sur les Tuniciers. Zoological results of the Cambridge Expedition to the Suez Canal, 1924. **Transactions of the Zoological Society of London**, v. 22, n. 3, 365-373. 1927b.
- HARMS, J. Check list of species (algae, invertebrates and vertebrates) found in the vicinity of the island of Helgoland (North Sea, German Bight) - a review of recente records. **Helgoländer Meeresunters**, v. 47, p. 1-34. 1993.
- HARRIS, H.R. On the rapid conversion of haematoxylin into haematein in staining reactions. **Journal of Applied Microscopy**, v. 3, p. 777-780. 1900.
- HARTL, D.L.; CLARCK, A.G. **Princípios de Genética de Populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 660p.

- HARTMEYER, R. Zur Kenntnis phlebobranchiater und diktyobranchiater Ascidien. **Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin**, v. 13, n. 1, p. 157-196. 1926.
- HEBERT, P.D.N.; RATNASINGHAM, S.; WAARD, J.R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London, B (Suppl.)**, v. 270, S96-S99. 2003.
- HELLMUTH, M.; WIESEKE, N.; LECHNER, M.; LENHOF, H.P.; MIDDENDORF, M.; STADLER, P.F. Phylogenomics with paralogs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 7, p. 2058-2063. 2015.
- HERDMAN, W.A. Preliminary report on the Tunicata of the Challenger expedition. Cynthiidae. **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh**, v. 11, n. 3, p. 52-88. 1881.
- HEY, J. The mind of the species problem. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n.7, p. 326-329. 2001.
- HIJMANS, R.J.; GUARINO, L.; MATHUR, P. DIVA-GIS. Version 7.5. **A geographic information system for the analysis of species distribution data**. 2004. Disponível em: <<http://www.diva-gis.org/download>>. Acesso em: 08 out. 2017.
- HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. (eds) **Molecular Systematics**. Sinauer, Massachusetts. 1996. 655p.
- HIROSE, E. Ascidian tunic cells: morphology and functional diversity of free cells outside the epidermis. **Invertebrate Biology**, v. 128, n. 1, p. 83-96. 2009.
- HOPKINS, G.W.; FRECKLETON, R.P. Declines in the numbers of amateur and professional taxonomists: implications for conservation. **Animal Conservation**, v. 5, p. 245-249. 2002.
- HOYLE, G. The response mechanism in ascidians. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 31, n. 2, p. 287-305. 1952.
- HUANG, Z.; CHEN, L. Preliminary study on the biofoulings in two harbours of Taiwan Province of China. **Acta Oceanologica Sinica**, v. 24, n. 6, p. 92-98. 2001.
- HUANG, Y.; FENG, D.; KE, C.; ZHOU, S. The determination of larval metamorphic competence of *Styela canopus* Savigny. **Acta Oceanologica Sinica**, v. 22, n. 3, p. 459-466. 2003.
- HUELSENBECK, J.P.; RANNALA, B. Frequentist Properties of Bayesian Posterior Probabilities of Phylogenetic Trees Under Simple and Complex Substitution Models. **Systematic Biology**, v. 53, n. 6, p. 904-913. 2004.
- HUNTSMAN, A.G. Ascidians from the coasts of Canada. **Transactions of the Canadian Institute**, v. 9, p. 111-148. 1911.
- HUXEL, G.R. Rapid displacement of native species by invasive species: effects of hybridization. **Biological Conservation**, v. 89, p. 143-152. 1999.

## J

- JAFFARALI, A.; AKRAM S.A., ARSHAN K.M.L. New distribution data on ascidians fauna (Tunicata: Ascidiacea) from Mandapam coasts, Gulf of Mannar, India. **Biodiversity Data Journal**, v. 4, e7855. 2016.
- JARMAN, S.N.; WARD, R.D.; ELLIOTT, N.G. Oligonucleotide primers for PCR amplification of coelomate introns. **Marine Biotechnology**, v. 4, p. 347-355. 2002.
- JOHANNESSON, H. Parallel speciation: a key to sympatric divergence. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 3, p. 148-153. 2001.
- JOLLIFFE, I.T. **Principal Component Analysis**. 2 ed. New York: Springer-Verlag. 1986. 487p.
- JÖRGER, K.M.; NORENBURG, J.L.; WILSON, N.G.; SCHRÖDL, M. Barcoding against a paradox? Combined molecular species delineations reveal multiple cryptic lineages in elusive meiofaunal sea slugs. **Evolutionary Biology**, v. 12, p. 1-18. 2012.
- JÖRGER, K.M.; SCHRÖDL, M. How to describe a cryptic species? Practical challenges of molecular taxonomy. **Frontiers in Zoology**, v. 10, n. 59, p. 2-27. 2013.



JUTE, A.H.C.; GOBIN, J.F.; ROCHA, R.M. A preliminary list of ascidians for the island of Trinidad, West Indies. **Marine Biodiversity Records**, v. 6, p. 1-4. 2013.

## K

- KATOH, K. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 3059-3066. 2002.
- KATOH, K.; STANDLEY, D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 772-780. 2013.
- KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K.D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, p. 1-7. 2017.
- KEIGWIN, JR. L.D. Pliocene closing of the Isthmus of Panama, based on biostratigraphic evidence from nearby Pacific Ocean and Caribbean Sea cores. **Geology**, v. 6, p. 630-634. 1978.
- KEITH, I.; DAWSON, T.P.; COLLINS, K.J.; CAMPBELL, M.L. Marine invasive species: establishing pathways, their presence and potential threats in the Galapagos Marine Reserve. **Pacific Conservation Biology**, v. 22, n. 4, p. 377-385. 2016.
- KEKKONEN, M.; HEBERT, P.D.N. DNA barcode-based delineation of putative species: efficient start for taxonomic workflows. **Molecular Ecology Resources**, v. 14, p. 706-715. 2014.
- KELLY, R.P.; SARKAR, I.N.; EERNISSE, D.J.; DESALLE, R. DNA barcoding using chitons (genus *Mopalia*). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 177-183. 2007.
- KIMURA, M. Possibility of extensive neutral evolution under stabilizing selection with special reference to nonrandom usage of synonymous codons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 9, p. 5773-5777. 1981.
- KNOWLTON, N. Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea. **Hydrobiologia**, v. 420, p. 73-90. 2000.
- KONDOW, A.; SUZUKI, T.; YOKOBORI, S.; UEDA, T.; WATANABE, K.. An extra tRNA<sup>Gly</sup>(U\*CU) found in ascidian mitochondria responsible for decoding non-universal codons AGA/AGG as glycine. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 12, p. 2554-2559. 1999.
- KORNELIUSSEN, T.S.; MOLTKE, I.; ALBRECHTSEN, A.; NIELSEN, R. Calculation of Tajima's D and other neutrality test statistics from low depth next-generation sequencing data. **BMC Bioinformatics**, v. 14, p. 289. 2013.
- KOTT, P. The Ascidian of Australia. I - Stolidobranchiata Lahille and Phlebobranchiata Lahille. **Australian Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 3, n. 3, p. 205-333. 1952.
- KOTT, P. Stolidobranch and Phlebobranch Ascidians of the Queensland Coast. **University of Queensland Papers**, v. 7, n. 2, p. 127-152. 1964.
- KOTT, P. The Australian Ascidiacea Part I, Phlebobranchia and Stolidobranchia. **Memoirs of the Queensland Museum**, v. 23, p. 1-440. 1985.
- KOTT, P.; GOODBODY, I. **The ascidians of Hong Kong**. Proceedings of the First International Marine Biological Workshop: The Marine Flora and Fauna of Hong Kong and Southern China. Hong Kong. Hong Kong University Press. 1980. p. 503-554.

## L

- LABOREL, J.; PÉRÈS, J.M.; PICARD, J.; VACELET, J. Étude directe des fonds des parages de Marseille de 30 à 300 m avec la soucoupe plongeante Cousteau. **Bulletin du Musée océanographique de Monaco**, v. 1206, p. 1-16. 1961.
- LAFARGUE, F.; RAMOS, A.A.; TURON, X.; BANAIGS, B.; WAHL, M. The littoral ascidians of the Spanish mediterranean. I - From Port Bou to the Islas Medas. **Vie Milieu**, v. 36, n. 2, p. 133-139. 1986.

- LAMBERT, G. Nonindigenous Ascidians in Tropical Waters. **Pacific Science**, v. 56, n. 3, p. 291-298. 2002.
- LAMBERT, G. Marine biodiversity of Guam: the Ascidiacea. **Micronesica**, v. 35-36, p. 588-597. 2003.
- LAMBERT, C.C.; LAMBERT, G. Non-indigenous ascidians in southern California harbors and marinas. **Marine Biology**, v. 130, p. 675-688. 1998.
- LAMBERT, C.C.; LAMBERT, G. Persistence and differential distribution of nonindigenous ascidians in harbors of the Southern California Bight. **Marine Ecology Progress Series**, v. 259, p. 145-161. 2003.
- LAMBERT, G.; FAULKES, Z.; LAMBERT, C.C.; SCOFIELD, V.L. Ascidians of South Padre Island, Texas, with a key to species. **Texas Journal of Science**, v. 57, n. 3, p. 251-262. 2005.
- LEACHÉ, A.D.; FUJITA, M.K. Bayesian species delimitation in West African forest geckos (*Hemidactylus fasciatus*). **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 277, p. 3071-3077. 2010.
- LEE, S.S.C.; TEO, S.L.M.; LAMBERT, G. New records of solitary ascidians on artificial structures in Singapore waters. **Marine Biodiversity Records**, p. 1-18. 2013.
- LEE, S.S.C.; CHAN, J.Y.H.; TEO, S.L.M.; LAMBERT, G. State of knowledge of ascidian diversity in South China Sea and new records for Singapore. **Raffles Bulletin of Zoology**, v. 34, p. 718-743. 2016.
- LEMEY, P.; SALEMI, M.; VANDAMME, A-M. **The Phylogenetic Handbook. A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing**. 2. ed. New York: Cambridge University Press. 2009. 723p.
- LEUNG TACK KIT, D. Étude qualitative et quantitative des salissures biologiques de plaques expérimentales immergées em pleine eau - 5, les ascidies. **Tethys**, v. 7, n. 2-3, p. 223-234. 1975.
- LÉVI, C. Inventaire de la Faune Marine de Roscoff - Nemertes, Tuniciers. **Aux Travaux de la Station Biologique de Roscoff**, v. 7, p. 1-19. 1955.
- LI, H.X.; YAN, Y.; HE, W.H.; ZOU, X.L. An ecological study on fouling in the waters off the Bailong Peninsula in the Beibu Gulf. **Journal of Tropical Oceanography**, v. 29, n. 3, p. 108-113. 2010.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452. 2009.
- LINS, D.M.; MARCO JR., P.; ANDRADE, A.F.A.; ROCHA, R.M. Predicting global ascidian invasions. **Diversity and Distributions**, v. 24, p. 692-704. 2018.
- LÓPEZ-LEGENTIL, S.; TURON, X. Population genetics, phylogeography and speciation of Cystodytes (Ascidacea) in the western Mediterranean Sea. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 88, p. 203-214. 2006.
- LÓPEZ-LEGENTIL, S.; DIECKMANN, R.; BONTEMPS-SUBIELOS, N.; TURON, X.; BANAIGS, B. Qualitative variation of alkaloids in color morphs of *Cystodytes* (Ascidacea). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 1107-1119. 2005.
- LÓPEZ-LEGENTIL, S.; TURON, X.; PLANES, S. Genetic structure of the star sea squirt, *Botryllus schlosseri*, introduced in southern European harbours. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 3957-967. 2006.
- LÓPEZ-MÁRQUEZ, V.; ACEVEDO, I.; MANJÓN-CABEZA, M. E.; GARCÍA-JIMÉNEZ, R.; TEMPLADO, JOSÉ.; MACHORDOM, A. Looking for morphological evidence of cryptic species in *Asterina* Nardo, 1834 (Echinodermata: Asteroidea). The redescription of *Asterina pancerii* (Gasco, 1870) and the description of two new species. **Invertebrate Systematics**, v. 32, p. 505-523. 2018.
- LOTUFO, T.M.C. **Ascidacea (Chordata: Tunicata) do litoral tropical brasileiro**. 183 f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.



## M

- MA, K.C.K.; DEIBEL, D.; LAW, K.K.M.; AOKI, M.; MCKENZIE, C.H.; PALOMARES, M.L.D. Richness and zoogeography of ascidians (Tunicata: Ascidiacea) in eastern Canada. **Canadian Journal of Zoology**, v. 95, p. 51-59. 2017.
- MADDISON, W.P.; MADDISON, D.R. **Mesquite**: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.31. 2017. Disponível em: <<http://mesquite-project.org>>. Acesso em: 21 jan. 2018.
- MANTEL, N. The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. **Cancer Research**, v. 27, n. 2, p. 209-220. 1967.
- MARINS, F.O.; NOVAES, R.L.M.; ROCHA, R.M.; JUNQUEIRA, A.O.R. Non indigenous ascidians in port and natural environments in tropical Brazilian bay. **Zoologia**, v. 27, n. 2, p. 213-221. 2010.
- MARTIN, D.; RYBICKI, E. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. **Bioinformatics**, v. 16, p. 562-563. 2000.
- MARTIN, D.P.; MURREL, B.; GOLDEN, M.; KHOOSAL, A.; MUHIRE, B. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. **Virus Evolution**, v. 1, n. 1, p. 1-5. 2015.
- MATEUS, A.M. **Fundamentos de Zoologia Sistemática**. 1 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1989. 305p.
- MAYDEM, R.L. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. In: CLARIDGE, M.F.; DAWA, H.A.; WILSON, M.R. (eds.). **Species: The Units of Biodiversity**. Londres, Chapman & Hall. p. 381-424. 1997.
- MAYER-PINTO, M.; JUNQUEIRA, A.O.R. Effects of organic pollution on the initial development of fouling communities in a tropical bay, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 1495-1503. 2003.
- MAYR, E. **Systematics and the origin of species. From the viewpoint of a zoologist**. New York: Columbia University Press. 1942. 334p.
- MAYR, E. What Is a Species, and What Is Not? **Philosophy of Science**, v. 63, n. 2, p. 262-277. 1996.
- MEGAN, M.; PIEROSI, P.; RATNASINGHAM, S. **BoldSystems**. Barcode of Life Data Systems Handbook. v. 3,6. Ontario: Biodiversity Institute of Ontario. 2013. 34p.
- MICHAELSEN, W. Vorläufige Mittheilung über einige Tunicaten aus dem Magalhaensischen Gebiet, sowie von Süd-Georgien. **Zoologischer Anzeiger**, v. 21, p. 363-371. 1898.
- MICHAELSEN, W. Die Ptychobranchen und Diktyobranchen Ascidien des westlichen Indischen Ozeans. **Jahrbuch des Hamburgischen Wissenschaftlichen Anstalten, Hamburg**, v. 35, n. 2, p. 1-73. 1918a.
- MICHAELSEN, W. **Ascidia Ptychobranchia und Dictyobranchia des Roten Meeres. Expedition S. M. Schiff "Pola" in das Rote Meer, nördliche und südliche Hälfte, 1895/96-1897/98**. Zoologische Ergebnisse, v. 32. Hölder, 1918b. 120p.
- MICHAELSEN, W. The ascidians of the Cape Province of South Africa. **Transactions of the Royal Society of South Africa**, v. 22, p. 129-163. 1934.
- MICKEVICH, M.F.; JOHNSON, M.S. Congruence between morphological and allozyme data in evolutionary inference and character evolution. **Systematic Biology**, v. 25, p. 260-270. 1976.
- MILLAR, R.H. On a collection of ascidians from the Gold Coast. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v. 123, n. 2, p. 277-325. 1953.
- MILLAR, R.H. On a collection of ascidians from South Africa. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v. 125, n. 1, p. 169-221. 1955.
- MILLAR, R.H. Ascidiacea. **Discovery Reports**, v. 30, p. 1-160. 1960.
- MILLAR, R.H. Ascidians from Mozambique. **Annals and Magazine of Natural History**, v. 13, n. 1, p. 11-16. 1961.
- MILLAR, R.H. Further description of South African Ascidians. **Annals of the South African Museum**, v. 46, n. 7, p. 112-221. 1962.

- MILLAR, R.H. South African Ascidians Collected by Th. Mortensen, with some additional Material. **Videnskabelige Meddelelser fra Dansk Naturhistorisk Forening Robenhavn**, v. 127, p. 159-180. 1964.
- MILLAR, R.H. **Ascidians of European waters. Catalogue of main marine fouling organisms (found on ships coming into European water) 4**. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development. 1969. 34p.
- MILLAR, R.H.. British Ascidians - Tunicata: Ascidiacea. Keys and Notes for the Identification of the Species. **Synopses of the British Fauna**, v. 1, p. 1-88. 1970.
- MILLAR, R.H.. Ascidians (Tunicata: Ascidiacea) from the northern and north-eastern Brazilian Shelf. **Journal of Natural History**, v. 11, p. 169-223. 1977.
- MILLAR, R.H. Ascidians collected during the International Indian Ocean expedition. **Journal of Natural History**, v. 22, p. 823-8484. 1988.
- MILLER, M.A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**, v. 1, p. 1-8. 2010.
- MIYA, T.; MAKABE, K.W.; SATOH, N. Expression of a Gene for Major Mitochondrial Protein, ADP/ATP Translocase, during Embryogenesis in the Ascidian *Halocynthia roretzi*. **Development Growth & Differentiation**, v. 36, n. 1, p. 39-48. 1994.
- MONNIOT, C. Les blocs a *Microcosmus* des fonds chalutables de la region de Banyuls-sur-mer. **Vie et Milieu**, v. 16, n. 2B, p. 819-849. 1965.
- MONNIOT, C. Sur une collection d'ascidies de Dakar (Phlébobranches et Stolidobranches). **Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle**, v. 41, n. 3, p. 622-654. 1969a.
- MONNIOT, C. Ascidies récoltées par la Thalassa Sur la Pente du Plateau Continental du Golfe de Gascogne. **Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle**, v. 41, n. 1, p. 173-176. 1969b.
- MONNIOT, C. Campagne de la Calypso au large des cotes atlantiques de L'Amérique du Sud (1961-1962). Ascidies Phlébobranches et Stolidobranches. **Annales de l'Institut Océanographique**, v. 47, p. 33-59. 1970.
- MONNIOT, C. Ascidies Stolidobranches des Bermudes. **Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle 57, Zoologie**, v. 43, p. 617-643. 1972.
- MONNIOT, C. Ascidies littorales de Guadalupe IV. Styelidae. **Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle**, v. 5, n. 2, p. 423-456. 1983.
- MONNIOT, C. Ascidies de Nouvelle-Calédonie IV. Styelidae (suite). **Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle**, v. 10, n. 2, p. 163-196. 1988.
- MONNIOT, C. Ascidies de Nouvelle-Calédonie X. Stolidobranches (suite). **Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle**, v. 4, n. 13, p. 1-37. 1991.
- MONNIOT, C. Stolidobranch ascidians from the tropical western Indian Ocean. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 135, p. 65-120. 2002.
- MONNIOT, F.; MONNIOT, C. Sept espèces d'Ascidies profondes de Méditerranée. **Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle - Zoologie**, v. 232, p. 1117-1133. 1975.
- MONNIOT, C.; MONNIOT, F. Ascidies de la Côte du Mozambique. **Revue de Zoologie Africaine**, v. 90, n. 2, p. 357-393. 1976.
- MONNIOT, C.; MONNIOT, F. Les Ascidies de Polynésie française. Mémoires du Muséum National D'Histoire Naturelle - **Zoologie**, v. 136, p. 1-155. 1987.
- MONNIOT, C.; MONNIOT, F. Additions to the inventory of eastern tropical atlantic ascidians: arrival of cosmopolitan species. **Bulletin of Marine Science**, v. 54, n. 1, p. 71-93. 1994.
- MONNIOT, C.; MONNIOT, F. Ascidians from the tropical western Pacific. **Zoosystema**, v. 23, n. 2, p. 201-388. 2001.
- MONNIOT, C.; MONNIOT, F. Ascidies de la pente externe et bathyales de l'ouest Pacifique. **Zoosystema**, v. 25, n. 4, p. 681-749. 2003.

- MONNIOT, C.; MONNIOT, F.; LABOUTE, P. Ascides du port de Papeete (Polynésie française): relations avec le milieu naturel et apports intercontinentaux par la navigation. **Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle**, v. 7, n. 3, p. 481-495. 1985.
- MONNIOT, C.; MONNIOT, F.; LABOUTE, P. **Coral Reef Ascidiens of New Caledonia**. Collection Faune tropicale 30. Paris, Orstom. 1991. 247p.
- MONNIOT, F.; MARTOJA, R.; MONNIOT, C. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 20, n. 6, p. 541-552. 1992.
- MONNIOT, C.; MONNIOT, F.; GRIFFITHS, C.L.; SCHLEYER, M. South African Ascidiens. **Annals of the South African Museum**, v. 108, n. 1, p. 1-141. 2001.
- MOORE, H.B. Marine fauna of the Isle of Man. **Proceedings and Transactions of the Liverpool Biological Society**, v. 50, p. 1-24. 1937.

## N

- NARANJO, S.A.; CARBALLO, J.L.; GARCÍA-GÓMEZ, J.C. Effects of environmental stress on ascidian populations in Algeciras Bay (Southern Spain). Possible marine bioindicators? **Marine Ecology Progress Series**, v. 144, p. 119-131. 1996.
- NEIGEL, J.E.; AVISE, J.C. Phylogenetic relationships of mitochondrial DNA under various demographic models of speciation. In: KARLIN, S.; NEVO, E. (eds.) **Evolutionary Processes and Theory**. Part V. Population Genetics: Observation, Experiment and Theory. Elsevier. p. 515-534. 1986.
- NICOLAU, M.S.J.C. **Caracterização da Macrofauna Bentónica da Baía de Luanda-Angola**. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Marinha) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve, Faro, 2016.
- NISHIKAWA, T. Ascidiens from the Coast of Kii Peninsula, middle Japan, with descriptions of two new species. **Memoirs of the National Science Museum**, v. 13, p. 97-111. 1980.
- NISHIKAWA, T. Ascidiens collected in the vicinity of the Oga Peninsula, the Japan Sea. **Memoirs of the National Science Museum**, v. 17, p. 149-161. 1984a.
- NISHIKAWA, T. Ascidiens from the Truk Islands, Ponape Island and Majuro Atoll (Tunicata, Ascidiacea). **Proceedings of the Japanese Society of Systematic Zoology**, v. 27, p. 107-140. 1984b.
- NISHIKAWA, T. The Ascidiens of the Japan Sea II. **Publications of the Seto Marine Biological Laboratory**, v. 35, n. 1-3, p. 25-170. 1991.
- NISHIKAWA, T. The Ascidiens of the Japan Sea III. **Publications of the Seto Marine Biological Laboratory**, v. 35, n. 6, p. 303-334. 1992.
- NOSIL, P.; VINES, T.H.; FUNK, D.J. Perspective: reproductive isolation caused by natural selection against immigrants from divergent habitats. **Evolution**, v. 59, n. 4, p. 705-719. 2005.
- NUIN, P.A.; WANG, Z.; TILLIER, E.R. The accuracy of several multiple sequence alignment programs for proteins. **Bioinformatics**, v. 7, p. 471. 2006.
- NYDAM, M.L.; HARRISON, R.G. Polymorphism and divergence within the ascidian genus *Ciona*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 56, n. 2, p. 718-726. 2010a.
- NYDAM, M.L.; HARRISON, R.G. Introgression despite substantial divergence in a broadcast spawning marine invertebrate. **Evolution**, v. 54, n. 2, p. 429-442. 2010b.
- NYDAM, M.L.; GIESBRECHT, K.B.; STEPHENSON, E.E. Origin and Dispersal History of Two Colonial Ascidian Clades in the *Botryllus schlosseri* Species Complex. **PLoS One**, v. 12, n. 1, e0169944. 2017.

## O

- O'BRIEN, C.E.; JOHNSTON, M.W.; KERSTETTER, D.W. Ports and pests: Assessing the threat of aquatic invasive species introduced by maritime shipping activity in Cuba. **Marine Pollution Bulletin**, v. 125, n. 1-2, p. 92-102. 2017.
- O'DEA, A. *et al.* Formation of the Isthmus of Panama. **Science Advances**, v. 2, n. 8, e1600883. 2016.
- OLIVEIRA-FILHO, R.; LOTUFO, T.M.C. *Styela cearense* n. sp. (Ascidacea: Styelidae) from the Northeastern Brazilian Coast. **Zootaxa**, v. 3981, n. 2, p. 284-290. 2015.
- ORDÓÑEZ, V.; PASCUAL, M.; FERNÁNDEZ-TEJEDOR, M.; TURON, X. When invasion biology meets taxonomy: *Clavelina oblonga* (Ascidacea) is an old invader in the Mediterranean Sea. **Biological Invasions**, v. 18, n. 4, 1203e1215. 2016.

## P

- PALUMBI, S.R. Genetic divergence, reproductive isolation and marine speciation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 25, p. 547-72. 1994.
- PALUMBI, S.R.; BAKER, C.S. Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. **Molecular Biology and Evolution**, v. 11, p. 426-35. 1994.
- PEARSON, K. Mathematical contributions to the theory of evolution. On a form of spurious correlation which may arise when indices are used in the measurement of organs. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 60, p. 489-498. 1897.
- PENNATI, R.; FICETOLA, G.F.; BRUNETTI, R.; CAICCI, F.; GASPARINI, F.; GRIGGIO, F.; SATO, A.; STACH, T.; KAULSTREHLOW, S.; GISSI, C.; MANN, L. Morphological Differences between Larvae of the *Ciona intestinalis* Species Complex: Hints for a Valid Taxonomic Definition of Distinct Species. **PLoS One**, v. 10, n. 5, e0122879. 2015.
- PÉRÈS, J.M. Contribution à l'étude des Ascidies de la côte occidentale d'Afrique. **Bulletin de l'Institut Française d'Afrique Noire**, v. 11, n. 1-2, p. 159-207. 1949.
- PÉRÈS, J.M. Nouvelle contribution à l'étude des Ascidies de la côte occidentale d'Afrique. **Bulletin de l'Institut Française d'Afrique Noire**, v. 13, n. 4, p. 1051-1071. 1951.
- PÉRÈS, J.M. Contribution à l'étude des Ascidies de Tunisie. **Bulletin de Station Oceanographique de Salammbo**, v. 49, p. 3-21. 1954.
- PÉRÈS, J.M. Résultats des campagnes scientifiques de la "Calypso": études sur le seuil Siculotunisien, v. II. Ascidies. **Annales de l'Institut océanographique de Paris**, v. 32, p. 256-304. 1956.
- PÉRÈS, J.M. Ascidies récoltées dans les parages des Baléares par le Professeur Lacaze-Duthiers (2 partie): Iviza et San Antonio. **Vie Milieu**, suppl. 6, p. 223-234. 1957.
- PÉRÈS, J.M. Ascidies recoltées sur les cotes Méditerranéennes d'Israel. **Bulletin of the Research Council of Israel - Section B: Zoology**, v. 7, n. 3-4, p. 143-150. 1958a.
- PÉRÈS, J.M. Ascidies de la Baie de Haifa collectées par E. Gottlieb. **Bulletin of the Research Council of Israel - Section B: Zoology**, v. 7, n. 3-4, p. 151-164. 1958b.
- PÉRÈS, J.M. Origine et affinités du peuplement en ascidies de la Méditerranée. I. État actuel des connaissances sur la faune des ascidies de la Méditerranée. **Rapports et procès-verbaux des reunions - Conseil permanent international pour l'exploration de la mer**, v. 14, p. 493-502. 1958c.
- PÉRÈS, J.M. Résultats des campagnes scientifiques de la "Calypso": campagne de la Calypso en mer d'Alboran et dans la baie Ibéro-Marocaine, v. I. Ascidies. **Annales de l'Institut océanographique de Paris**, v. 37, p. 296-313. 1959.
- PÉRÈS, J.M. Sur une collection d'ascidiens de la cote israélienne de la mer rouge et la peninsula du Sinai. **Bulletin of Sea Fisheries Research Station (Haifa)**, v. 30, p. 39-47. 1962.



- PÉREZ-PORTELA, R.; BISHOP, J.D.D.; DAVIS, A.R.; TURON, X. Phylogeny of the families Pyuridae and Styelidae (Stolidobranchiata, Ascidiacea) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 50, p. 560-570. 2009.
- PÉREZ-PORTELA, R.; ARRANZ, V.; RIUS, M.; TURON, X. Cryptic speciation or global spread? The case of a cosmopolitan marine invertebrate with limited dispersal capabilities. **Scientific Reports**, v. 3, n. 3197, p. 1-10. 2013.
- PESTANA, L.B.; DIAS, G.M.; MARQUES, A.C. A century of introductions by coastal sessile marine invertebrates in Angola, South East Atlantic Ocean. **Marine Pollution Bulletin**, v. 125, n.1-2, p 462-432. 2017.
- PFENNINGER, M.; SCHWENK, K. Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 121, p. 1-6. 2007.
- PINEDA, M.C.; LÓPEZ-LEGENTIL, S.; TURON, X. The whereabouts of an ancient wanderer: global phylogeography of the solitary ascidian *Styela plicata*. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. 1-14. 2011.
- PLANTE, R.; VASSEUR, P. Sur une collection d'ascidies de la région de Tuléar (Cote sud-ouest de Madagascar). Recueil des travaux de la station marine d'Endoume-Marseille. **Annales de la Faculté des Sciences de Madagascar**, v. 3, p. 133-142. 1966.
- PLOUGH, H.H. **Sea Squirts of the Atlantic Continental Shelf from Maine to Texas**. Baltimore: Johns Hopkins University Press. 1978. 118p.
- POE, S.; WIENS, J.J. Character selection and the methodology of morphological phylogenetics. In: WIENS, J.J. (ed.) **Phylogenetic Analysis of Morphological Data**. Smithsonian Institution Press. 2000. p. 20-36.
- PONS, J.; BARRACLOUGH, T.; GOMEZ-ZURITA, J.; CARDOSO, A.; DURAN, D.; HAZELL, S.; KAMOUN, S.; SUMLIN, W.D.; VOGLER, A.P. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. **Systematic Biology**, v. 55, p. 595-609. 2006.
- POWELL, S.J.; MEDD, S.M.; RUNSWICK, M.J.; WALKER, J.E. Two Bovine Genes for Mitochondrial ADP/ATP Translocase Expressed Differently in Various Tissues. **Biochemistry**, v. 28, p. 866-873. 1989.
- PUILLANDRE, N.; LAMBERTS, A.; BROUILLET, S.; ACHAZ, G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 1864-1877. 2012.

## R

- RACH, J.; DESALLE, R.; SARKAR, I.N.; SCHIERWATER, B.; HADRYIS, H. Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 275, p. 237-247. 2008.
- RADHALAKSHMI, R.; SIVAKUMAR, V.; ABDUL JAFFAR ALI, H. Analysis of selected species of ascidians as bioindicators of metals in marine ecosystem. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 8, p. 755-764. 2014.
- RAMOS ESPLÁ, A.A. Els Ascidis de les Illes Medes. In: OLIVELLA, J.R.; GILI, J.M. (eds.) **Els sistemes naturals de les illes Medes**. Arxius de la Secció de Ciències 73. Barcelona: IEC. p 581-596. 1984.
- RAMOS ESPLÁ, A.A. Ascidas de las islas Columbretes. In: MATILLA, A.L.A.; CARRETERO, J.L.; GARCIA-CARRASCOSA, A.M. (eds.) **Islas Columbretes. Contribución al estudio de su medio natural**. Valencia: Generalitat Valenciana. p. 473-476. 1987.
- RAMOS ESPLÁ, A.A. **Ascidas litorales del Mediterráneo ibérico. Faunística, ecología y biogeografía**. 405 f. Tese (Doutorado em Biología) - Departamento de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales, Universidad de Alicante, Valencia, 1988.
- RAMOS ESPLÁ, A.A.; JOANDOMENEC, R. Tipos biológicos em ascidas litorales de substratos duros. **Bentos**, v. 6, p. 284-299. 1990.

- RAMOS ESPLÁ, A.A.; BUENCUERPO, V.; VASQUEZ, E.; LAFARQUE, F. Some biogeographical remarks about the Ascidian littoral fauna of the Straits of Gibraltar (Iberian sector). **Bulletin de l'Institut Océanographique**, v. 9, p. 125-132. 1992.
- RANNALA, B.; YANG, Z. Bayes Estimation of Species Divergence Times and Ancestral Population Sizes Using DNA Sequences From Multiple Loci. **Genetics**, v. 164, p. 1645-1656. 2003.
- RANNALA, B.; YANG, Z. Improved Reversible Jump Algorithms for Bayesian Species Delimitation. **Genetics**, v. 194, p. 245-253. 2013.
- RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P.D.N. BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 355-364. 2007.
- RAUFASTE, N.; ROUSSET, F. Are partial Mantel Test adequate? **Evolution**, v. 55, n. 8, p. 1703-1705. 2001.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. **Evolution**, v. 49, p. 1280-1283. 1995.
- RAZKIN, O.; GÓMEZ-MOLINER, B.J.; VARDINOYANNIS, K.; MARTÍNEZ-ORTÍ, A.; MADEIRA, M.J. Species delimitation for cryptic species complexes: case study of *Pyramidula* (Gastropoda, Pulmonata). **Zoologica Scripta**, v. 46, n. 1, p. 55-72. 2017.
- RHO, B.J.; CHOE, B.L.; SONG, J.I.; LEE, Y.J. Ascidiens of Tangsa and its Adjacent Waters in Korea Strait. **The Korean Journal of Systematic Zoology**, v. 16, n. 1, p. 39-53. 2000.
- RICCIARDI, A. Facilitative interactions among aquatic invaders: is an 'invasional meltdown' occurring in the Great Lakes? **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 58, p. 2513-2525. 2001.
- RICE, W.R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v. 43, p. 223-225. 1989.
- RIISGARD, H.U. The ascidian pump: properties and energy cost. **Marine Ecology Progress Series**, v. 47, p. 129-134. 1988.
- RIUS, M.; PASCUAL, M.; TURON, X. Phylogeography of the widespread marine invader *Microcosmus squamiger* (Ascidacea) reveals high genetic diversity of introduced populations and non-independent colonizations. **Diversity and Distributions**, v. 14, p. 818-828. 2008.
- RIUS, M.; TESKE, P.R. A revision of the *Pyura stolonifera* species complex (Tunicata, Ascidacea), with a description of a new species from Australia. **Zootaxa**, v. 2754, p. 27-40. 2011.
- RIUS, M.; TESKE, P.R. Cryptic diversity in coastal Australasia: a morphological and mitonuclear genetic analysis of habitat-forming sibling species. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 168, p. 597-611. 2013.
- ROCHA, R.M.; BONNET, N.Y.K. Ascídias (Tunicata, Ascidiacea) introduzidas no Arquipélago de Alcatrazes, São Paulo. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 99, n. 1, p. 27-35. 2009.
- ROCHA, R.M.; KREMER, L.P. Introduced Ascidiens in Paranaguá Bay, Paraná, southern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 4, p. 1170-1184. 2005.
- ROCHA, R.M.; FARIA, S.B.; MORENO, T.R. Ascidiens from Bocas del Toro, Panama. I. Biodiversity. **Caribbean Journal of Science**, v. 41, n. 3, p. 600-612. 2005a.
- ROCHA, R.M.; MORENO, T.R.; METRI, R. Ascídias (Tunicata, Ascidiacea) da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 2, p. 461-476. 2005b.
- ROCHA, R.M.; KREMER, L.P.; BAPTISTA, M.S.; METRI, R. Bivalve cultures provide habitat for exotic tunicates in southern Brazil. **Aquatic Invasions**, v. 4, n. 1, p. 195-205. 2009.
- ROCHA, R.M.; GUERRA-CASTRO, E.; LIRA, C.; PAULS, S.M.; HERNÁNDEZ, I.; PÉREZ, A.; SARDI, A.; PÉREZ, J.; HERRERA, C.; CARBONINI, A.K.; CARABALLO, V.; SALAZAR, D.; DIAZ, M.C.; CRUZ-MOTTA, J.J. Inventory of ascidiens (Tunicata, Ascidiacea) from the National Park La Restinga, Isla Margarita, Venezuela. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 1, p. 210-218. 2010.
- ROCHA, R.M.; DIAS, G.M.; LOTUFO, T.M.C. Checklist das ascídias (Tunicata, Ascidiacea) do Estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 1a, p. 1-11. 2011.



- ROCHA, R.M.; BONNET, N.Y.K.; BAPTISTA, M.S.; BELTRAMIN, F.S. Introduced and native Phlebobranch and Stolidobranch solitary ascidians (Tunicata: Ascidiacea) around Salvador, Bahia, Brazil. **Zoologia**, v. 29, n. 1, p. 39-53. 2012.
- RODRIGUES, S.A.; ROCHA, R.M.; LOTUFO, T.M.C. **Guia ilustrado para identificação de ascídias do Estado de São Paulo**. São Paulo: FAPESP. 1998. 190p.
- RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D.L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M.A.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539-542. 2012.
- ROUSSET, F. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distances. **Genetics**, v. 145, p. 1219-1228. 1997.
- ROUX, C.; TSAGKOGEOGA, G.; BIERNE, N.; GALTIER, N. Crossing the Species Barrier: Genomic Hotspots of Introgression between Two Highly Divergent *Ciona intestinalis* Species. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 7, p. 1574-1587. 2013.

## S

- SALGADO-BARRAGÁN, J.; MÉNDEZ, N.; TOLEDANO-GRANADOS, A. *Ficopomatus miamiensis* (Polychaeta: Serpulidae) and *Styela canopus* (Ascidiacea: Styelidae), non-native species in Urías estuary, SE Gulf of California, Mexico. **Cahiers de Biologie Marine**, v. 45, p. 167-173. 2004.
- SANAMYAN, K.E.; SANAMYAN, N.P. Deep-water ascidians (Tunicata: Ascidiacea) from the northern and western Pacific. **Journal of Natural History**, v. 40, n. 5-6, p. 307-344. 2006.
- SANFORD, E.; KELLY, M.W. Local Adaptation in Marine Invertebrates. **Annual Review of Marine Science**, v. 3, p. 509-535. 2011.
- SATO, A. SATOH, N.; BISHOP, J.D.D. Field identification of 'types' A and B of the ascidian *Ciona intestinalis* in a region of sympatry. **Marine Biology**, v. 159, p. 1611-1619. 2012.
- SAVIGNY, J.C. **Mémoires sur les animaux sans vertèbres**. Seconde partie - Description et Classification des Animaux invertébrés, non articulés, connus sous les noms de Mollusques, de Radiaires, de Polypes, etc. Paris: G. Dufour. 1816. 305p.
- SCHLICK-STEINER, B.C.; SEIFERT, B.; STAUFFER, C.; CHRISTIAN, E.; CROZIER, R.H.; STEINER, F.M. Without morphology, cryptic species stay in taxonomic crypsis following discovery. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 22, n. 8, p. 391-392. 2007.
- SCHLUTER, D. Ecology and the origin of species. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 7, p. 372-380. 2001.
- SCOTLAND, R.W.; OLMSTEAD, R.G.; BENNET, J.R. Phylogeny Reconstruction: The Role of Morphology. **Systematic Biology**, v. 52, n. 4, p. 539-548. 2003.
- SEEBENS, H.; GASTNER, M.T.; BLASIUS, B. The risk of marine bioinvasion caused by global shipping. **Ecology Letters**, v. 16, n. 6, p. 782-790. 2013.
- SHEETS, E.A.; COHEN, C.S.; RUIZ, G.M.; ROCHA, R.M. Investigating the widespread introduction of a tropical marine fouling species. **Ecology and Evolution**, p. 1-19. 2016.
- SHENKAR, N. Ascidian (Chordata, Ascidiacea) diversity in the Red Sea. **Marine Biodiversity**, v. 42, p. 459-469. 2012.
- SHENKAR, N.; SWALLA, B.J. Global Diversity of Ascidiacea. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. 1-12. 2011.
- SHENKAR, N.; SHMUEL, Y.; HUCHON, D. The invasive ascidian *Ciona robusta* recorded from a Red Sea marina. **Marine Biodiversity**, p. 1-4. 2017.
- SHENKAR, N.; GITTENBERGER, A.; LAMBERT, G.; RIUS, M.; MOREIRA DA ROCHA, R.; SWALLA, B.J.; TURON, X. **Ascidiacea World Database**. Disponível em: <<http://www.marinespecies.org/ascidiacea>>. Acesso em: 03 mai 2018.

- SHERTZER, H.G.; RACKER, E. Reconstitution and Characterization of the Adenine Nucleotide Transporter Derived from Bovine Heart Mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 8, p. 2446-2452. 1976.
- SIMKANIN, C.; FOFONOFF, P.; LARSON, K.; RUIZ, G. Spatial and temporal dynamics of ascidian invasions in the continental United States and Alaska. **Marine Biology**, v. 163, p. 1-16. 2016.
- SIMÕES, M.B. **Contribuição para o conhecimento da fauna de Ascidiacea da Ilha da Boa Viagem, Niterói, Rio de Janeiro**. 94 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1981.
- SIMPSON, G.G. The Species Concept. **International Journal of Organic Evolution**, v. 5, n. 4, p. 285-298. 1951.
- SITES, J.W. JR.; MARSHALL, J.C. Operational Criteria For Delimiting Species. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 35, p. 199-227. 2004.
- SKINNER, L.F.; BARBOZA, D.F.; ROCHA, R.M. Rapid Assessment Survey of introduced ascidians in a region with many marinas in the southwest Atlantic Ocean, Brazil. **Management of Biological Invasions**, v. 7, n. 1, p. 13-20. p. 2016.
- SLUITER, C.P. Tunicaten. In Semon R. Zoologische Forschungsreisen in Australien und den malagischen Archipel Denkschr. Gesellsch. **Jena**, v. 8, p. 163-186. 1895.
- SLUITER, C.P. **Die Tunicaten Der Siboga-Expedition**. I. Die Socialen Und Holosomen Ascidiën. Monographie LVIIa aus Uitkomsten Op Zoologisch, Botanisch, Oceanographisch en Geologisch Gebied. Leiden, Boekhandel En Drukkerij. 1904. 126 p.
- SOUISSI, A.; GAGNAIRE, P.A.; BONHOMME, F.; BAHRI-SFAR, L. Introgressive hybridization and morphological transgression in the contact zone between two Mediterranean Solea species. **Ecology and Evolution**, v. 7, p. 1394-1402. 2017.
- STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, p. 1312-1313. 2014.
- STEPHENS, M.; DONNELLY, P. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. **American Journal of Human Genetics**, v. 73, p. 1162-1169. 2003.
- STEPHENS, M.; SMITH, N.J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **American Journal of Human Genetics**, v. 68, p. 978-989. 2001.
- SUKUMARANA, J.; KNOWLES, L.L. Multispecies coalescent delimits structure, not species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 7, p. 1607-1612. 2017.

## T

- TABOADA, S.; LEIVA, C.; BAS, M.; SCHULT, N.; MCHUGH, D. Cryptic species and colonization processes in *Ophryotrocha* (Annelida, Dorvilleidae) inhabiting vertebrate remains in the shallow-water Mediterranean. **Zoologica Scripta**, v. 45, n. 5, p. 611-624. 2017.
- TAJIMA, F. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. **Genetics**, v. 123, p. 585-595. 1989.
- TAMILSELVI, M.; SIVAKUMAR, V.; ABDUL JAFFAR ALI, H.; THILAGA, R.D. Distribution of alien tunicates (ascidians) in Tuticorin Coast, India. **World Journal of Zoology**, v. 6, n. 2, p. 164-172. 2011.
- TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, p. 512-526. 1993.
- TARJUELO, I.; POSADA, D.; CRANDALL, K.A.; PASCUAL, M.; TURON, X. Cryptic species of *Clavelina* (Ascidiacea) in two different habitats: harbours and rocky littoral zones in the northwestern Mediterranean. **Marine Biology**, v. 139, n. 3, p. 455-462. 2001.

- TARJUELO, I.; POSADA, D.; CRANDALL, K.A.; PASCUAL, M.; TURON, X. Phylogeography and speciation of colour morphs in the colonial ascidian *Pseudodistoma crucigaster*. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 3125-3136. 2004.
- TEMPLETON, A.R. The theory of speciation *via* the founder principle. **Genetics**, v. 94, p. 1011-1038. 1980.
- TEMPLETON, A.R. Mechanisms of speciation - A population genetic approach. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 12, p. 23-48. 1981.
- TEMPLETON, A.R. Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of humans and apes. **Evolution**, v. 37, n. 2, p. 221-244. 1983.
- TEMPLETON, A.R. Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 779-791. 2001.
- TEMPLETON, A.R.; CRANDALL, K.A.; SING, C.F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. **Genetics**, v. 132, p. 619-633. 1992.
- TESKE, P.R.; RIUS, M.; MCQUAID, C.D.; STYAN, C.A.; PIGGOTT, M.P.; BENHISSOUNE, S.; FUENTES-GRÜNEWALD, C.; WALLS, K.; PAGE, M.; ATTARD, C.R.M.; COOKE, G.M.; MCCLUSKY, C.F.; BANKS, S.C.; BARKER, N.P.; BEHEREGARAY, L.B. "Nested" cryptic diversity in a widespread marine ecosystem engineer: a challenge for detecting biological invasions. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 176, p. 1-13. 2011.
- TESKE, P.R.; PAPADOPOULOS, I.; BARKER, N.P.; MCQUAID, C.D.; BEHEREGARAY, L.B. Mitonuclear discordance in genetic structure across the Atlantic/Indian Ocean biogeographical transition zone. **Journal of Biogeography**, v. 41, p. 392-401. 2014.
- THOMPSON, H. The Tunicata of the Scottish area. Their classification, distribution and ecology. Part III - Sedentary Tunicata (Countd.) Order Diktobranchia. **Fishery Board for Scotland, Science Investigation**, v. 2, p. 3-44. 1932.
- TOH, K.B.; NG, C.S.L.; WU, B.; TOH, T.C.; CHEO, P.R.; TUN, K.; CHOU, L.M. Spatial variability of epibiotic assemblages on marina pontoons in Singapore. **Urban Ecosystems**, v. 20, p. 183-197. 2017.
- TOKIOKA, T. Contributions to Japanese Ascidian Fauna IV. Notes on some ascidians collected in Osaka Bay (1). **Publications of the Seto Marine Biological Laboratory**, v. 1, n. 4, p. 11-25. 1951.
- TOKIOKA, T. Contributions to Japanese Ascidian Fauna V. Ascidians collected near the Marine Biological Laboratory of Hiroshima University in the Inland Sea (1). **Publications of the Seto Marine Biological Laboratory**, v. 3, n. 1, p. 1-25. 1953a.
- TOKIOKA, T. **Ascidians of Sagami Bay**. Tokyo, Iwanami Shoten. 1953b. 315p.
- TOKIOKA, T. Invertebrate fauna of the intertidal zone of the Tokara Islands. VII - Ascidians. **Publications of the Seto Marine Biological Laboratory**, v. 4, n. 1, p. 75-98. 1954a.
- TOKIOKA, T. Contributions to Japanese Ascidian Fauna X. Notes on some ascidians collected in Osaka Bay (2). **Publications of the Seto Marine Biological Laboratory**, v. 3, n. 3, p. 1-26. 1954b.
- TOKIOKA, T. Contributions to Japanese Ascidian Fauna XI. Sporadic Memoranda (2). **Publications of the Seto Marine Biological Laboratory**, v. 4, n. 2-3, p. 205-218. 1955.
- TOKIOKA, T. Contributions to Japanese Ascidian Fauna XVII. Ascidians found in the benthonic samples dredged in the Ariake Sea 1957-58. **Publications of the Seto Marine Biological Laboratory**, v. 8, n.1, p. 205-221. 1960.
- TOKIOKA, T. Ascidians collected during the Melanesia expedition of the Osaka Museum of Natural History. I – Ascidians presented by Dr. R.L.A. Catala of the Aquarium of Noumea. **Publications of the Seto Marine Biological Laboratory**, v. 9, n. 1, p. 103-139. 1961.
- TOKIOKA, T. Contributions to Japanese Ascidian Fauna XVIII. Ascidians from Sado Island and some records from Sagami Bay. **Publications of the Seto Marine Biological Laboratory**, v. 10, n. 1, p. 1-20. 1962.

- TOKIOKA, T. Contributions to Japanese Ascidian Fauna XX. The outline of Japanese Ascidian Fauna as compared with that of the Pacific coasts of North America. **Publications of the Seto Marine Biological Laboratory**, v. 11, n. 1, p. 131-155. 1963.
- TOKIOKA, T. Contributions to Japanese Ascidian Fauna XII. Ascidiaceans from Sado Island. **Publications of the Seto Marine Biological Laboratory**, v. 15, n. 3, p. 239-244. 1967.
- TOKIOKA, T. On a small collection of ascidiaceans from the Pacific Coast of Costa Rica. **Publications of the Seto Marine Biological Laboratory**, v. 19, n. 6, p. 383-408. 1972.
- TOKIOKA, T.; NISHIKAWA, T. Contributions to the Japanese ascidian fauna XXVII. Some Ascidiaceans from Okinawa, with notes on a small collection from Hong Kong. **Publications of the Seto Marine Biological Laboratory**, v. 22, p. 323-341. 1975.
- TRACY, B.M.; LARSON, K.J.; ASHTON, G.V.; LAMBERT, G.; CHANG, A.L.; RUIZ, G.M. Northward range expansion of three non-native ascidiaceans on the west coast of North America. **BioInvasions Records**, v. 6, n. 3, p. 203-209. 2017.
- TUCKER, G.H. The histology of the gonads and the egg envelopes of an ascidian (*Styela plicata* Lesueur). **Journal of Morphology**, v. 70, p. 81-113. 1942.
- TUKEY, J.W. **The problem of multiple comparisons**. Mimeographs. Princeton: Princeton University. 1953.
- TURON, X. Las ascidias de Tossa de Mar (Girona). I. Generalidades. **Faunística y Taxonomía. Miscellania Zoológica**, v. 11, p. 221-231. 1987a.
- TURON, X. Estudio morfológico de las espinulas sifonales en las especies del género *Microcosmus* (Ascidiaceae) del litoral mediterráneo español. **Anales de Biología**, v. 11, n. 3, p. 37-42. 1987b.
- TURON, X. Ascidiaceans of the dredge grounds of the Catalan coast (Mediterranean noroccidental). **Investigacion Pesquera (Barcelona)**, v. 52, n. 4, p. 467-481. 1988a.
- TURON, X. Some ascidiaceans from Namibia (SW Africa). **Monografía de Zoología Marina**, v. 3, p. 267-291. 1988b.
- TURON, X.; LÓPEZ-LEGENTIL, S. Ascidian molecular phylogeny inferred from mtDNA data with emphasis on the Aplousobranchiata. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 33, p. 309-320. 2004.
- TURON, X.; TARJUELO, I.; DURAN, S.; PASCUAL, M. Characterising invasion processes with genetic data: an Atlantic clade of *Clavelina lepadiformis* (Ascidiaceae) introduced into Mediterranean harbours. **Hydrobiologia**, v. 503, p. 29-35. 2003.

## V

- VAN DER SLOOT, C.J. Ascidiaceans of the family Styelidae from the Caribbean. **Studies on the Fauna of Curaçao and other Caribbean Islands**, v. 110, p. 1-57. 1969.
- VAN NAME, W.G. The ascidiaceans of the Bermuda Islands. **Transactions of Connecticut Academy of Science**, v. 11, p. 325-412. 1902.
- VAN NAME, W.G. Ascidian from the Philippines and adjacent waters. **Bulletin of the United States National Museum**, v. 1, n. 2, p. 91-92. 1918.
- VAN NAME, W.G. Ascidiaceans of the West Indian Region and Southeastern United States. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 44, p. 283-494. 1921.
- VAN NAME, W.G. The North and South American ascidiaceans. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 84, p. 1-476. 1945.
- VAN VALEN, L. Morphological variation and width of ecological niche. **The American Naturalist**, v. 99, n. 908, p. 377-390. 1965.
- VASSEUR, P. Ascidiaceans of Nouvelle-Calédonie. Paris. **Edition de la Fondation Singer Polignac**, p. 127-146. 1967a.
- VASSEUR, P. Contribution à l'étude des ascidiaceans de L'île Maurice (Archipel des Mascareignes, Océan Indien). **Recueil des Travaux de la Stations Marine d'Endoume**, Suppl. 6, p. 101-139. 1967b.



- VENKAT, K.; ANIL, A.C.; KHANDEPARKER, D.C.; MOKASHE, S.S. Ecology of ascidians in the macrofouling community of New Mangalore port. *Indian Journal of Marine Sciences*, v. 24, p. 41-43. 1995.
- VERGARA-CHEN, C.; GONZÁLEZ-WANGÜEMERT, M.; MARCOS, C.; PÉREZ-RUZAF, A. Genetic diversity and connectivity remain high in *Holothuria polii* (Delle Chiaje 1823) across a coastal lagoon-open sea environmental gradient. *Genetica*, v. 138, p. 895-906. 2010.
- VERON, S.; DAVIES, T.J.; CADOTTE, M.W.; CLERGEAU, P. PAVOINE, S. Predicting loss of evolutionary history: Where are we? *Biological Reviews*, v. 92, n. 1, p. 271-291. 2015.
- VIA, S. Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 16, n. 7, p. 381-390. 2001.

## W

- WANG, C.; GUANG, H.; JINGYU, S.; LONGMEI, Z. Chemical Constituents of the Tunicate *Styela canopus* from the Dayawan Bay. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, v. 29, n. 2, p. 168-170. 2001.
- WICKSTEN, M.K. Why are there Bright Colors in Sessile Marine Invertebrates? *Bulletin of Marine Science*, v. 45, n. 2, p. 519-530. 1989.
- WILSON, E.O. Taxonomy as a fundamental discipline. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 359, p. 739. 2004.
- WILLIAMS, S.L. Introduced species in seagrass ecosystems: Status and concerns. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 350, p. 89-110. 2007.
- WIRTZ, P.; MELO, G.; GRAVE, S. Symbioses of decapod crustaceans along the coast of Espírito Santo, Brazil. *Marine Biodiversity Records*, v. 2, p. 1-9. 2009.
- WONG, E. H-K.; SHIVJI, M.S.; HANNER, R. H. Identifying sharks with DNA barcodes: assessing the utility of a nucleotide diagnostic approach. *Molecular Ecology Resources*, v. 9, s. 1, p. 243-256. 2009.
- WONG Y.T.; MEIER, R.; TAN, K.S. High haplotype variability in established Asian populations of the invasive Caribbean bivalve *Mytilopsis sallei* (Dreissenidae). *Biological Invasions*, v. 13, p. 341-348. 2011.
- WORM, B.; BARBIER, E.B.; BEAUMONT, N.; DUFFY, E.; FOLKE, C.; HALPERN, B.S.; JACKSON, J.B.C.; LOTZE, H.K.; MICHELI, F.; PALUMBI, S.R.; SALA, E.; SELKOE, K.A.; STACHOWICZ, J.J.; WATSON, R. Impacts of Biodiversity Loss on Ocean Ecosystem Services. *Science*, v. 314, p. 787-790. 2006.
- WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, v. 16, p. 97-159. 1931.
- WRIGHT, S. Isolation by distance. *Genetics*, v. 28, p. 114-138. 1943.
- WU, C-I. The genic view of the process of speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 14, p. 851-865. 2001.

## X

- XIA, X. Assessing substitution saturation with DAMBE. In: LEMEY, P.; SALEMI, M.; VANDAMME, A. (eds.) *The Phylogenetic Handbook: a Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. 2 ed. Cambridge: Cambridge University Press. 723p. 2009.
- XIA, X. DAMBE5: A Comprehensive Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, v. 30, p. 1720-1728. 2013.
- XIA, X.; HAFNER, M.S.; SUDMAN, P.D. On Transition Bias in Mitochondrial Genes of Pocket Gophers. *Journal of Molecular Evolution*, v. 43, p. 32-40. 1996.
- XIA, X.; XIE, Z.; SALEMI, M.; CHEN, L.; WANG, Y. An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 26, p. 1-7. 2003.



## Y

- YAN, S.; HUANG, Z. Study of fouling organisms in Daya Bay, China. **Biofouling**, v. 2, p. 229-237. 1990.
- YANG, Z. The BPP program for species tree estimation and species delimitation. **Current Zoology**, v. 61, n. 5, p. 854-865. 2015.
- YANG, Z.; RANNALA, B. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 20, p. 9264-9269. 2010.
- YEN, AL.; ITTERBEECK, J.V. No taxonomists? No progress. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 2, n. 4, p. 223-224. 2016.
- YING, H.; CAIHUAN, K.; DANQING, F.; SHIQIANG, Z.; FUXUE, L. Observations on the morphology of embryonic and larval development in *Styela canopus* Savigny. **Acta Oceanologica Sinica**, v. 22, n. 4, p. 621-628. 2003.
- YOKOBORI, S.; UEDA, T.; WATANABE, K. Codons AGA and AGG Are Read as Glycine in Ascidian Mitochondria. **Journal of Molecular Evolution**, v. 36, p. 1-8. 1993.

## Z

- ZACHOS, F.E. Taxonomic inflation, the Phylogenetic Species Concept and lineages in the Tree of Life - a cautionary comment on species splitting. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 53, n. 2, p. 180-184. 2015.
- ZANUY, H. Lista de ascídias cubanas. **Poeyana**, v. 388, p. 1-7. 1990.
- ZHAN, A.; BRISKI, E.; BOCK, D.G.; GHABOOL, S.; MACISAAC, H.J. Ascidiaceans as models for studying invasion success. **Marine Biology**, v. 162, p. 2449-2470. 2015.
- ZHANG, J.; KAPLI, P.; PAVLIDIS, P.; STAMATAKIS, A. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. **Bioinformatics**, v. 29, n. 22, p. 2869-2876. 2013.
- ZHOU, X-H.; GAO, S.; HUI, S.L. Methods for Comparing the Means of Two Independent Log-Normal Samples. **Biometrics**, v. 53, p. 1129-1135. 1997.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

### Suplemento 1. Registros históricos da distribuição de *Styela canopus* desde 1816.

Oceano/Mar	País	Registro(s)	Referência(s)
Atlântico Norte - Leste e Tropical	Escócia	Desconhecido 56°42'N 4°4'O	Thompson (1932)
	Holanda	Mar do Norte 56°30'N 3°30'L	Sluiter (1904)
	Alemanha	Ilha Helgoland, Mar do Norte 54°10'N 7°53'L	Harms (1993)
	Inglaterra	Ilha de Man 54°15'N 4° 27'O	Moore (1937)
	Inglaterra	Canal da Mancha, Channel Islands 50°11'N 0°31'L	Alder & Hancock (1907), Hartmeyer (1926), Van Name (1945), Monniot <i>et al.</i> (1992)
	Inglaterra	Costa sul 50°36'N 1°51'O	Millar (1970)
	Inglaterra	Estuário de Salcombe 50°14'N 3°46'O	Berril (1950)
	Inglaterra	Canal da Mancha, Channel Islands 50°11'N 0°31'O	Alder & Hancock (1907), Hartmeyer (1926), Van Name (1945), Monniot <i>et al.</i> (1992)
	França	Roscoff 48°43'N 3°59'O	Lévi (1955)
	Espanha	Baía de Algeciras (1992-1993) 36°08'N 5°24'O	Naranjo <i>et al.</i> (1996)
	Portugal	Ilha da Madeira, Quinta do Lorde (2006) 32°44'N 16°42'O	Canning-Clode <i>et al.</i> (2013)
	Mauritânia	Porto de Nouadhibou, Port-Étienne (1948) 20°56'N 17°02'O	Pérès (1949)
	Senegal	Porto de Dakar (1947-1950) 14°40'N 17°25'O	Pérès (1951), Monniot (1969a), Monniot & Monniot (1994)
	Serra Leoa	Desconhecido 8°31'N 13°15'O	Monniot & Monniot (1994)
	Gana	Takoradi 4°54'N 1°44'O	Millar (1953)
Atlântico Norte - Oeste	Canadá	Nova Scotia, New Brunswick 44°40'N 63°44'O	Ma <i>et al.</i> (2017)
	Canadá	Costa leste (1908-1910) 43°32'N 68°36'O	Huntsman (1911)
	EUA	Massachusetts, Baía de Massachusetts 42°22'N 70°44'O	Van Name (1945), Plough (1978)
	EUA	Massachusetts, Woods Hole (1923) 41°31'N 70°40'O	Allee (1923)
	EUA	Nova Jersey 40°03'N 74°24'O	Plough (1978)
	EUA	Maryland, Baltimore 39°17'N 76°36'O	Plough (1978)
	EUA	Carolina do Norte, Beaufort 34°43'N 76°39'O	Plough (1978)
	EUA	Carolina do Sul 33°18'N 79°23'O	Van Name (1921)

**Suplemento 1.** Registros históricos da distribuição de *Styela canopus* desde 1816 (continuação).

Oceano/Mar	País	Registro(s)	Referência(s)
Atlântico Norte - Oeste	EUA	Geórgia, Ilha de Sapelo 31°23'N 81°16'O	Plough (1978)
	EUA	Texas, Baía de Galveston (2002) 29°18'N 94°47'O	Simkanin <i>et al.</i> (2016)
	EUA	Texas, Corpus Christi (2002) 27°48'N 97°23'O	Simkanin <i>et al.</i> (2016)
	EUA	Texas, Ilha South Padre (2004) 26°6'N 97°10'O	Lambert <i>et al.</i> (2005)
	EUA	Florida, Key Biscayne, Baía de Apalache 25°41'N 80°9'O	Van Name (1921), Goodbody (1984a), Plough (1978)
Caribe e América Central	Panamá	Baía do Panamá 8°48'N 79°9'O	Van Name (1945), Tokioka (1963)
	Panamá	Canal do Panamá (2002-2009) 9°6'N 79°40'O	Carman <i>et al.</i> (2011)
	Panamá	Bocas del Toro (2003) 9°10'N 82°30'O	Rocha <i>et al.</i> (2005a)
	Trinidad e Tobago	Marinas Peakes e Power Boats (2008) 10°25'N 61°20'O	Jute <i>et al.</i> (2013)
	Venezuela	Golfo de Cariaco 10°30'N 63°59'O	Caraballo-Péres & Díaz (2011)
	Venezuela	Margarita, Puente de la Restinga 10°59'N 63°56'O	Rocha <i>et al.</i> (2010), Guerra-Castro (2011)
	Curaçao	Spaanse Water 12°4'N 68°51'O	Goodbody (1984a)
	Curaçao	Baía de Piscadera (1963-1964) 12°7'N 68°59'O	Van der Sloot (1969)
	Granada	Ilha Hog 12°7'N 61°40'O	Goodbody (1984a)
	Bonaire	Pekelmeer, Lac de Bonaire 12°11'N 68°15'O	Goodbody (1984a), Goodbody (1984b)
	Aruba	Spaan Lagoe, Bucuti Reef 12°30'N 70°0'O	Goodbody (1984a)
	França	Martinica 14°40'N 61°0'O	Monniot (1983), Goodbody (1984a)
	França	Guadalupe 16°15'N 61°35'O	Monniot (1983), Goodbody (1984a)
	Belize	Pelican Cays 17°4'N 88°42'O	Goodbody (2000)
	Jamaica	Royal Port 17°56'N 76°50'O	Goodbody (1984a), Goodbody (2003)
	Porto Rico	Porto de Guanica 17°59'N 66°54'O	Van Name (1921)
	São Tomás	Baía de Benner 18°19'N 64°51'O	Goodbody (1984a)
	Cuba	Havana (1945, 1986) 23°7'N 82°23'O	Van Name (1921), Zanuy (1990), O'Brien (2017)
	Bermudas	Ilhas Bermudas 32°18'N 64°47'O	Van Name (1902), Berril (1932), Monniot (1972)
Atlântico Sul - Leste	<b>Angola</b>	<b>Baía de Luanda (2014)</b> <b>8°37'S 13°13'L</b>	<b>Novo registro</b>
	Namíbia	Benguela 22°06'S 14°16'L	Turon (1988b)

**Suplemento 1.** Registros históricos da distribuição de *Styela canopus* desde 1816 (continuação).

Oceano/Mar	País	Registro(s)	Referência(s)
Atlântico Sul - Leste	África do Sul	Cidade do Cabo (1929-1930) 33°55'S 18°25'L	Millar (1964)
	África do Sul	False Bay 34°13'S 18°38'L	Monniot <i>et al.</i> (2001)
Atlântico Sul - Oeste	Brasil	Ceará, Pecém (2001) 3°33'S 38°49'O	Lotufo (2002)
	Inglaterra	Ilha Ascension 7°56'S 14°22'O	Millar (1960)
	Brasil	Pernambuco, Cabo de S. Agostinho (1999) 8°16'S 35°01'O	Lotufo (2002)
	Brasil	Bahia, Baía de Todos os Santos (1999) 12°58'S 38°30'O	Millar (1977), Lotufo (2002), Rocha <i>et al.</i> (2012)
	<b>Brasil</b>	<b>Espírito Santo, Vitória (2016) 20°19'S 40°17'O</b>	<b>Novo registro</b>
	Brasil	Rio de Janeiro, Búzios (1998) 22°45'S 41°53'O	Lotufo (2002)
	Brasil	Rio de Janeiro, Ilha do Governador (1961) 22°48'S 43°12'O	Costa (1969)
	Brasil	Rio de Janeiro, Cabo Frio (1998) 22°53'S 42°1'O	Lotufo (2002)
	Brasil	Niterói, Ilha da Boa Viagem (1978-1979) 22°54'S 43°8'O	Simões (1981)
	Brasil	Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (1998) 22°57'S 43°10'O	Lotufo (2002)
	Brasil	Rio de Janeiro, Arraial do Cabo 22°58'S 42°1'O	Granthom-Costa <i>et al.</i> (2016)
	Brasil	Rio de Janeiro, Ilha Grande (1961-1962) 23°9'S 44°13'O	Monniot (1970), Mayer-Pinto & Junqueira (2003), Skinner <i>et al.</i> (2016)
	Brasil	Rio de Janeiro, Angra dos Reis (1998, 2005-2006) 23°15'S 44°43'O	Lotufo (2002), Marins <i>et al.</i> (2010)
	Brasil	São Paulo, Arquipélago de Alcatrazes (2002) 23°48'S 45°24'O	Rocha & Bonnet (2009)
	Brasil	São Paulo, São Sebastião 23°48'S 45°24'O	Rocha <i>et al.</i> (2011)
	Brasil	São Paulo, Santos e Guarujá 23°58'S 46°17'O	Rocha <i>et al.</i> (2011)
	Brasil	Paraná, Baía de Paranaguá (2005) 25°43'S 48°20'O	Rocha & Kremer (2005)
	Brasil	Santa Catarina, Penha (1998-2007) 26°47'S 48°37'O	Rocha <i>et al.</i> (2005b), Rocha <i>et al.</i> (2009)
	<b>Brasil</b>	<b>Santa Catarina, Gov. Cel. Ramos (2016) 27°18'S 48°33'O</b>	<b>Novo registro</b>
Mediterrâneo Leste	Egito	Lake Timsah 30°34'N 32°17'L	Ghobashy & Messeih (1991), Ghobashy & El Komy (1980)
	Egito	Canal de Suez (1902) 30°35'N 32°26'L	Savigny (1816), Hartmeyer (1926), Halim & Messeih (2016)

**Suplemento 1.** Registros históricos da distribuição de *Styela canopus* desde 1816 (continuação).

Oceano/Mar	País	Registro(s)	Referência(s)
Mediterrâneo Leste	Egito	Port Said 31°15'N 32°17'L	Ghobashy & Messeih (1991)
	Egito	Damietta 31°24'N 31°52'L	Ghobashy & Messeih (1991)
	Israel	Baía de Haifa (1955, 2014-2015) 32°47'N 34°59'L	Pérès (1958a), Pérès (1958b), Gewing & Shenkar (2017)
	França	Mar Mediterrâneo, Marseille 35°0'N 18°0'L	Harant (1927a), Laborel <i>et al.</i> (1961)
	Tunísia	Sousse (1954) 35°50'N 10°38'L	Pérès (1956)
	Gibraltar	Estreito de Gibraltar (1989) 36°08'N 5°21'O	Harant (1927b), Ramos Esplá <i>et al.</i> (1992)
	Tunísia	Khereddine (1953) 36°49'N 10°18'L	Pérès (1954)
	Itália	Porto de Palermo 38°11'N 15°34'L	Di Bella <i>et al.</i> (1998)
	Espanha	Maiorca (1953-1954) 38°58'N 1°16'L	Pérès (1957)
	Grécia	Mares gregos 39°4'N 23°18'L	Antoniadou <i>et al.</i> (2016)
Mediterrâneo Oeste	Espanha	Ilhas Baleares 39°32'N 2°51'L	Turon & López-Legentil (2004)
	Espanha	Costa Mediterrânea 39°50'N 0°28'O	Turon (1988a), Ramos Esplá & Joandomenec (1990)
	Espanha	Ilhas Columbretes 39°52'N 0°40'L	Ramos Esplá (1987)
	Espanha	Minorca (1958) 39°56'N 4°06'L	Pérès (1959)
	Espanha	Tossa de Mar, Girona (1984-1986) 41°43'N 2°55'L	Turon (1987a)
	Espanha	Ilha Medas (1977-1978, 1985) 42°2'N 3°13'L	Lafargue <i>et al.</i> (1986), Ramos Esplá (1984, 1988)
	Espanha	Porto de Bou (1985) 42°17'N 3°13'L	Lafargue <i>et al.</i> (1986), Ramos Esplá (1984, 1988)
	França	Banyuls sur-mer 42°28'N 3°7'L	Monniot (1965)
	França	Nice (1964-1965) 43°42'N 7°16'O	Leung Tack Kit (1975)
	Mônaco	Principado de Mônaco (1890-1910) 43°44'N 7°25'L	Harant (1925)
Mar Vermelho	Egito	Porto de Bernice (1895) 23°54'N 35°29'L	Michaelsen (1918b)
	Egito	Baía de Gimsah 27°38'N 33°32'L	Michaelsen (1918b)
	Israel	Mar Vermelho (1957) 28°45'N 35°1'L	Pérès (1958c), Pérès (1962), Shenkar (2012), Granot <i>et al.</i> (2017)
	Israel	Golfo de Eilat 29°33'N 34°57'L	Pérès (1962)
Índico	<b>Singapura</b>	<b>Estreito de Singapura</b> <b>1°17'N 103°8'E</b>	<b>Novo registro</b>
	Índia	Baía de Vizhinjam 8°23'N 76°59'E	Abdul & Sivakumar (2007), Jaffarali <i>et al.</i> (2016)
	Índia	Costa de Thoothukudi 8°48'N 78°11'E	Radhalakshmi <i>et al.</i> (2014), Ali & Tamilselvi (2016)



**Suplemento 1.** Registros históricos da distribuição de *Styela canopus* desde 1816 (continuação).

Oceano/Mar	País	Registro(s)	Referência(s)
Índico	Índia	Tuticorin, Golfo de Mannar (2007-2008) 9°15'N 76°23'L	Tamilselvi <i>et al.</i> (2011)
	Djibouti	Djibouti (1996) 11°36'N 43°10'L	Monniot (2002)
	Moçambique	Ilha Ibo (1995) 12°20'S 40°35'L	Monniot (2002)
	Iêmen	Ilha Socotra (1997) 12°26'N 53°39'L	Monniot (2002)
	Iêmen	Golfo de Aden (1964) 12°31'N 47°55'L	Millar (1988)
	Índia	Porto de Mangalore (1992-1993) 12°56'N 74°48'L	Venkat <i>et al.</i> (1995)
	Ilhas Maurício	Ilhas Mascarenhas 20°43'S 56°37'L	Vasseur, (1967b)
	Madagascar	Porto de Toliara (1962-1964) 23°21'S 43°41'L	Plante & Vasseur (1966)
	Moçambique	Estuário de Morrumbene 23°41'S 35°23'L	Millar (1962)
	Moçambique	Ilha Inhaca (1956, 1969) 26°0'S 32°54'L	Millar (1961), Monniot & Monniot (1976)
	Moçambique	Lourenço Marques, Porto de Durban, Ilha Salibury (1951) 29°53'S 31°2'L	Michaelsen (1918a), Millar (1955)
	África do Sul	Porto de Elizabeth 33°57'S 25°36'L	Monniot <i>et al.</i> (2001)
	África do Sul	Baía de Still, Cape Province, Kommetjie 34°22'S 21°24'L	Michaelsen (1934), Monniot <i>et al.</i> (2001)
Pacífico Norte - Leste	EUA	Hawai, Pearl Harbor 21°20'N 157°58'O	Abbott <i>et al.</i> (1997)
	México	Estuário de Urías, Mazatlán (1993-1995) 23°14'N 106°24'O	Salgado-Barragán <i>et al.</i> (2004)
	EUA	Califórnia, San Diego (1994-1997, 2000) 32°44'N 117°15'O	Lambert & Lambert (1998), Lambert & Lambert (2003), Simkanin <i>et al.</i> (2016)
	EUA	Califórnia, Santa Bárbara (2015) 34°25'N 119°41'O	Tracy <i>et al.</i> (2017)
	Filipinas	Ilha Samal (1996) 7°6'N 125°39'L	Monniot & Monniot (2001)
Pacífico Norte - Oeste	Japão	Atol Majuro (1982) 7°6'N 171°11'L	Nishikawa (1984b)
	Palau	Ilha Ngermeuangel 7°18'N 134°30'L	Monniot & Monniot (2001)
	Costa Rica	Playas del Coco (1970) 10°33'N 85°41'O	Tokioka (1972)
	EUA	Ilha Guam, Micronesia (1998-2000) 13°27'N 144°47'L	Lambert (2003)
	China	Península de Bailong, Golfo de Beibu (2006-2007) 21°30'N 108°14'L	Li <i>et al.</i> (2010)
	China	Porto de Tolo 22°26'N 114°11'O	Kott & Goodbody (1980)

**Suplemento 1.** Registros históricos da distribuição de *Styela canopus* desde 1816 (continuação).

Oceano/Mar	País	Registro(s)	Referência(s)
Pacífico Norte - Oeste	China	Taiwan, Porto de Dapeng 22°27'N 120°28'L	Huang & Chen (2001)
	China	Kau Lau Wan Hoi 22°28'N 114°22'L	Kott & Goodbody (1980)
	China	Baía de Daya (1986-1987) 22°40'N 114°39'L	Yan & Huang (1990)
	China	Baía de Dayawan, Huizhou 23°6'N 114°24'L	Wang <i>et al.</i> (2001)
	China	Xiamen 24°26'N 118°4'L	Huang <i>et al.</i> (2003), Ying <i>et al.</i> (2003), Danqing <i>et al.</i> (2006), Feng <i>et al.</i> (2010)
	Japão	Ilhas Tokara 29°10'N 129°15'L	Tokioka (1954a), Tokioka (1963)
	Japão	Mar de Ariake (1957-1958) 32°59'N 130°20'L	Tokioka (1960)
	Japão	Ariake-Kai 33°4'N 130°15'L	Tokioka (1953b), Tokioka (1963)
	Japão	Península de Kii 34°16'N 135°52'L	Nishikawa (1980)
	Japão	Hirosima, Mar de Inland 34°20'N 132°25'L	Tokioka (1953a)
	Japão	Onomiti 34°24'N 133°12'L	Tokioka (1953b), Tokioka (1963)
	Japão	Baía de Osaka 34°32'N 135°11'L	Tokioka (1951), Tokioka (1954b), Tokioka (1963)
	<b>Japão</b>	<b>Ilha Sugashima (2015)</b> <b>34°32'N 136°59'L</b>	<b>Novo registro</b>
	Japão	Baía de Wakasa 34°39'N 134°58'L	Nishikawa (1991)
	Japão	Baía de Sagami 35°12'N 139°24'L	Tokioka (1953b), Tokioka (1963)
	Japão	Yokohama 35°26'N 139°38'L	Tokioka (1953b), Tokioka (1963)
	Japão	Tottori 35°30'N 134°14'L	Nishikawa (1991)
	Japão	Baía de Tsukumo 37°18'N 137°14'L	Nishikawa (1991)
	Japão	Ilha Sado (1979) 38°2'N 138°20'L	Tokioka (1962), Tokioka (1963), Tokioka (1967), Tokioka & Nishikawa (1975)
	Coreia	Mar da Coreia 38°19'N 127°14'L	Tokioka & Nishikawa (1975), Nishikawa (1992), Rho <i>et al.</i> (2000)
	Japão	Península de Oga (1983) 39°54'N 139°47'L	Nishikawa (1984a)
	Japão	Fukaura 40°38'N 139°55'L	Nishikawa (1991)
Pacífico Central	França	Polinésia Francesa (1997) 17°32'S 149°34'O	Monniot & Monniot (2003)
	França	Taiti, Papeete (1984) 17°40'S 149°27'O	Monniot <i>et al.</i> (1985), Monniot & Monniot (1987)
Pacífico Sul - Leste	<b>Equador</b>	<b>Galápagos, Ilha Baltra (2016)</b> <b>0°27'S 90°16'O</b>	<b>Novo registro</b>

**Suplemento 1.** Registros históricos da distribuição de *Styela canopus* desde 1816 (continuação).

Oceano/Mar	País	Registro(s)	Referência(s)
Pacífico Sul - Oeste	Austrália	Mar de Arafura 9°30'S 135°0'L	Sluiter (1895), Tokioka (1955)
	Nova Caledônia	Recifes de Coral 20°24'S 164°33'L	Monniot <i>et al.</i> (1991)
	Nova Caledônia	Loyalty Islands 21°4'S 167°21'L	Monniot (1991)
	Nova Caledônia	Saint-Vincent, Hugon (1961-1962)	Vasseur (1967a)
	Nova Caledônia	22°3'S 166°16'L	
	Nova Caledônia	Noumea (1958)	Tokioka (1961), Monniot (1988)
	Nova Caledônia	22°15'S 166°27'L	
	Austrália	Queensland, Baía de Moreton 27°8'S 153°2'L	Kott (1952, 1964, 1985)
	Austrália	Austrália ocidental 28°8'S 114°14'L	Abbott & Johnson (1972), Kott (1985)
	Austrália	Porto de Fremantle 32°3'S 115°44'L	Kott (1952)

**Suplemento 2.** Sequências utilizadas como grupo externo nas análises filogenéticas moleculares.***Botryllus schlosseri* - COI**

ATAAGTGTCTTCATTCTGTTTGAATTGTCTCAAGTAGGTCAGGTGGTTAGAGATAGGCAATTGTATAATGTAATTGTAAGTGCATGC  
TTTTGTGATGATTTTTTTTTTTGTTATACCTATGATAATTAGGAGGTTTGGTAATTGGTTATTACCTTTAATAGTGGGGAGTCCAGATAT  
GGCTTTTCCTCGATTAAATAATATAAGTTTTGATTGTTGCCCCCTGCTTTGTTTCTTTTGTAGAAGTCTATAATTGAAAGTGGAGT  
TAGGACTGGGTGAAGTGTATCCTCCCTTTCTAGAAATTTAGCTCATTCTAGAGCTGCTTTGGATTGTGCTATTTTTCTTTACATTT  
GGCTAGAGTGTCTAGTATTTTAAGATCTCTTAACCTTTATGACTACTTTGTTTAAATATAAAGGTAAGGTTGGGACTTTTTCTATATC  
TTTGTGTTGTTGAAGTGTATTGGTCACTACTATTTGTTATTATTATCTTTACCTGTTTTGGCAGCT

***Microcosmus squamiger* - COI**

ATAAGTGTCTTAATTCGTATGGAGCTGTCACAAACAGGTCCAGTAATTGGTGATGGGCAGTTGTATAATGTTATTGTCACTGCACATG  
CTTTTGAATAATCTTTTTTTTCGTTATGCCATAATAATTAGGGGTTTTGGAACTGGTTGTACCTTTGATATTAGGATCTCCTGATA  
TGGCTTTCCACGGTTAAATAATATGAGTTTTGGTTTTACCCCCAGCATTTTTCTACTCTTATTCTTCTCTATTGAGAGCGGTGT  
TAGGACAGGTTGGACAGTTTACCCTCCTTTAGCTGGGAATTTAGCACATTCAAGGCCAGCATTAGATAGTGCTATTTTTCTACTACATT  
TGGCTAGGGTTTCTAGTATCTTGGGTAGTTAAATTTTATAACTACTATATTTAATATAAAGGCAAGGTTGGAGATTATTTAATATA  
CCTTTATTGTATGGACTGTTTTAGTCACAACGGTTTTATTGTTATTATCTTTGCCAGTATTAGCTGCA

***Botrylloides nigrum* - COI (1-516) + ANT (517-736)**

ATAAGTGTATTTATCCGGTTAGAACTTTCTCAAATTGGACAGGTTGTTGGTGATGGACAATTATATAATGTTATTGTAACCGCACACGC  
TTTTGTTATAATTTTTTTCTTTGTTATGCCTATAATAATTAGGAGATTTGGTAATTGGTTACTGCCTTTAATAGTGGGAAGTCCGGATAT  
GGCTTTCCCTCGTCTTAATAATATAAGTTTTGGCTTTACCTCCTGCCTTATTTTTCTTTTATTAGTTCTATAATTGAGAGTGGAGTA  
AGAACGGGTTGAAGTGTATCCTCCTTTATCAAGGAATTTAGCTCATTCCGGAGCTGCTTTAGATTGTGCTATTTCTCCCTTCATTTA  
GCTAGAGTTTCTAGTATTTAAGATCTTTAAATTTTATAACCACCTTTGTTTAAATATAAAGTAAAGGTTGGAGGATATTTCAATATC  
TTTGTCTGTTGAAGTGTTTAGTTACGACTATTTGTTACTTTTATCTTTACCTGTTTTGGCTGCAGGCCCTTGGAAATTGTATCGCGACC  
ATTTTCAAGCAGGATGGGGCTAGAGGACTTTACCAAGGTTTCTTCGTATCTATACAAGGCATCATAGTCTATCGTGGGCTATTTTGG  
AACGTACGACACCGTCAAAGGAATGTTACCTGATCCAAAGAATACCCAGTAGTCGTAAGCTGGATGATTGCACAAACAGTAAGTAC  
AGGCGCTGGAATAGTTTCAT

**Suplemento 3.** Códigos de acesso do *GenBank* das sequências externas utilizadas nas análises filogenéticas moleculares.

<i>Styela clava</i>	HQ730800.1	HQ916445.1	HQ916369.1	HQ916396.1
<b>COI</b>	HQ730801.1	HQ916446.1	HQ916370.1	HQ916397.1
FJ528635.1	HQ730802.1	JX885722.1	HQ916371.1	HQ916398.1
GU328009.1	HQ730803.1	KC492160.1	HQ916372.1	HQ916399.1
GU328010.1	HQ730804.1	KC492161.1	HQ916373.1	HQ916400.1
GU328011.1	HQ730805.1	KC492162.1	HQ916374.1	HQ916402.1
GU328012.1	HQ730806.1	KC492164.1	HQ916375.1	HQ916403.1
GU328015.1	HQ730808.1	KC492167.1	HQ916377.1	HQ916404.1
GU328017.1	HQ730809.1	KM508852.1	HQ916378.1	HQ916406.1
GU328018.1	JQ742956.1	KM508853.1	HQ916379.1	HQ916407.1
GU328019.1	KC905096.1	KM508855.1	HQ916380.1	HQ916408.1
GU328022.1	KC905097.1	KM508863.1	HQ916381.1	HQ916409.1
GU328023.1	KC905098.1	KM508865.1	HQ916382.1	HQ916410.1
GU328024.1	KC905099.1	KU878146.1	HQ916383.1	HQ916413.1
GU328026.1	KC905100.1	KU878147.1	HQ916384.1	HQ916414.1
GU328027.1	KC905101.1	KU878151.1	HQ916385.1	HQ916415.1
GU328028.1	KC905102.1	KY111430.1	HQ916386.1	HQ916416.1
GU328029.1	KJ725171.1	KY111431.1	HQ916387.1	HQ916417.1
GU328031.1	KU647849.1	KY111432.1	HQ916388.1	HQ916418.1
GU328032.1	KY235620.1	<i>Styela plicata</i>	HQ916389.1	HQ916419.1
GU328034.1	<i>Styela plicata</i>	<b>ANT</b>	HQ916390.1	HQ916420.1
HQ730795.1	<b>COI</b>	HQ916363.1	HQ916391.1	HQ916421.1
HQ730796.1	HQ916430.1	HQ916364.1	HQ916392.1	HQ916422.1
HQ730797.1	HQ916433.1	HQ916365.1	HQ916393.1	HQ916423.1
HQ730798.1	HQ916441.1	HQ916367.1	HQ916394.1	
HQ730799.1	HQ916442.1	HQ916368.1	HQ916395.1	

**Suplemento 4.** Dados brutos da análise morfométrica.

ID	Métricos											Merísticos								
	CC	LC	CSO	CSA	DTD	Od1	Od2	Oe1	Oe2	CE	DO	TO	VLd	VLe	FM	Gd	Ge	PLE	LT	
AR01	16,0	9,0	2,4	2,9	0,77	8,1	7,1	7,6	7,6	7,8	0,1472	42	69	62	18	2	2	21	5	
AR02	18,0	9,0	2,4	3,1	0,55	9,5	6,6	7,8	5,0	10,5	0,1472	42	58	57	12	2	2	20	5	
AR03	15,0	7,0	2,6	1,4	0,55	7,4	5,5	6,2	3,8	8,3	0,1330	15	66	65	10	2	2	20	5	
AR04	19,0	10,0	5,7	5,2	0,66	12,6	0,0	10,2	6,9	8,8	0,1235	34	61	58	22	1	2	21	12	
AR05	15,0	6,0	4,5	4,8	0,50	7,8	5,0	6,6	5,5	7,1	0,1320	18	50	50	12	2	2	19	5	
AR06	23,0	15,0	3,5	4,0	0,82	12,4	8,6	14,7	8,6	12,4	0,0618	23	154	124	12	2	2	16	1	
AR07	14,0	7,0	2,0	1,5	0,38	6,4	5,5	6,2	4,5	8,8	0,1520	35	68	63	12	2	2	15	1	
AN01	17,0	6,0	1,0	0,8	0,60	8,3	6,9	5,7	3,1	11,4	0,1805	50	82	88	6	2	2	18	22	
AN02	18,0	9,0	1,2	1,9	0,60	6,4	5,9	9,5	5,2	12,8	0,1758	72	120	115	6	2	2	25	10	
AN03	17,0	11,0	1,4	1,0	0,66	11,2	7,8	7,8	6,7	10,7	0,1995	63	110	99	5	2	2	23	57	
AN04	18,0	12,0	1,5	0,9	0,33	8,6	5,9	6,4	3,3	16,4	0,1758	41	87	83	6	2	2	22	18	
AN05	10,0	8,0	1,5	0,8	0,28	5,5	3,1	5,2	4,8	4,8	0,1758	33	66	67	14	2	2	18	8	
AN06	15,0	9,0	2,0	2,0	0,66	5,6	5,0	3,8	3,5	9,5	0,1710	39	94	91	5	2	2	22	9	
AN07	19,0	11,0	1,2	1,5	0,82	13,5	9,7	8,6	8,6	12,4	0,1615	43	107	101	7	2	2	19	15	
AN08	10,0	4,0	1,5	0,5	0,33	2,1	2,0	2,6	2,4	3,3	0,1425	22	41	37	7	2	2	17	2	
BA01	14,0	9,0	0,7	0,9	0,44	5,2	4,8	5,2	4,3	7,1	0,1615	27	67	61	15	2	2	15	10	
BA02	13,0	8,0	2,4	1,9	0,55	6,5	5,2	5,0	3,6	6,2	0,1615	32	66	63	12	2	2	23	6	
BA03	10,0	7,0	1,3	0,8	0,44	4,8	4,8	5,9	3,3	4,8	0,1662	29	62	61	11	2	2	22	6	
BA04	11,0	6,0	1,7	1,4	0,44	5,7	4,8	5,2	3,6	5,0	0,1472	27	64	61	11	2	2	18	4	
BA05	10,0	6,0	1,6	1,0	0,33	3,8	3,6	5,2	2,9	3,8	0,1615	22	56	50	12	2	2	20	4	
BA06	11,0	5,0	1,3	1,5	0,33	6,4	5,2	5,5	4,3	5,0	0,1710	25	61	64	11	2	2	21	5	
BA07	13,0	7,0	1,5	1,5	0,38	0,0	0,0	0,0	0,0	6,7	0,0000	29	60	53	15	0	0	18	0	
BA08	14,0	6,0	2,0	2,0	0,50	6,9	4,5	6,2	5,2	6,4	0,1805	48	81	78	11	2	2	20	11	

**Suplemento 4.** Dados brutos da análise morfométrica (continuação).

ID	Métricos										Merísticos									
	CC	LC	CSO	CSA	DTD	Od1	Od2	Oe1	Oe2	CE	DO	TO	VLd	VLe	FM	Gd	Ge	PLE	LT	
BA09	10,0	5,0	1,8	1,3	0,44	4,5	4,0	2,9	2,4	4,0	0,1900	22	59	57	11	2	2	19	5	
BA10	12,0	6,0	1,0	1,0	0,55	4,8	4,3	5,2	3,3	5,5	0,1758	30	69	65	12	2	2	19	7	
BA11	13,0	6,0	1,8	2,0	0,50	5,9	4,8	7,1	5,0	6,2	0,152	40	76	75	12	2	2	28	8	
CE01	14,0	8,0	1,9	1,9	0,53	5,7	4,0	3,8	3,1	4,3	0,1320	55	65	60	12	2	2	21	4	
CE02	10,0	7,0	1,9	1,9	0,33	4,3	4,3	4,5	3,1	4,8	0,1225	35	68	66	10	2	2	18	1	
CE03	17,0	8,0	1,0	1,4	0,38	3,8	3,8	6,2	5,2	5,0	0,1264	37	74	78	10	2	2	23	1	
CE04	6,0	5,0	1,7	1,4	0,17	3,3	2,4	3,8	2,1	3,3	0,1235	35	55	51	10	2	2	25	1	
CE05	9,0	5,0	1,7	1,7	0,33	2,6	2,4	3,3	2,6	3,6	0,1302	33	49	50	11	2	2	24	2	
CE06	11,0	5,0	1,2	1,2	0,25	2,4	3,3	4,3	1,2	3,8	0,1330	47	57	55	12	2	2	18	1	
CE07	5,0	3,0	0,6	1,2	0,17	2,1	1,9	1,6	1,6	1,7	0,1178	34	37	34	7	2	2	14	1	
CE08	10,0	5,0	2,0	2,0	0,44	4,3	3,4	3,3	3,3	6,6	0,1283	41	61	70	9	2	2	21	7	
CE09	12,0	7,0	1,0	1,2	0,33	5,2	3,8	5,5	3,3	4,8	0,1378	36	65	66	7	2	2	26	1	
CE10	14,0	9,0	2,8	3,4	0,55	6,2	4,3	5,5	3,3	6,9	0,1188	46	89	85	12	2	2	23	1	
CE11	12,0	6,0	1,2	1,8	0,33	5,9	4,5	4,8	3,6	5,9	0,1425	31	54	57	9	2	2	20	3	
CE12	13,0	8,0	2,8	3,6	0,33	9,3	7,1	8,1	7,6	6,9	0,1330	58	67	69	12	2	2	24	4	
CR01	16,0	10,0	2,0	2,3	0,50	6,7	5,5	6,1	4,0	8,6	0,1520	24	53	59	11	2	2	23	9	
CR02	17,0	11,0	1,9	1,9	0,77	9,0	6,4	5,7	5,2	7,4	0,1501	16	61	61	11	2	2	18	9	
CR03	15,0	10,0	1,3	1,3	0,39	7,1	6,9	5,9	5,2	6,4	0,1349	17	61	61	11	2	2	20	5	
CR04	15,0	10,0	1,0	0,7	0,38	4,8	4,8	5,8	5,7	6,4	0,1368	18	59	56	11	2	2	21	6	
CR05	18,0	10,0	1,5	1,2	0,44	0,0	0,0	0,0	0,0	5,2	0,0000	15	57	57	14	0	0	21	0	
ES01	11,0	7,0	1,0	1,0	0,44	5,2	4,3	5,5	4,3	7,6	0,1853	36	69	65	13	2	2	21	4	
ES02	7,0	4,0	0,7	0,7	0,24	2,4	2,3	2,9	1,5	5,2	0,1758	28	55	47	7	2	2	12	2	
ES03	13,0	5,0	1,9	1,2	0,39	4,5	3,6	5,2	2,4	5,5	0,1330	50	51	50	11	2	2	22	3	
ES04	11,0	6,0	1,5	0,8	0,55	4,0	3,1	3,8	2,4	6,4	0,1425	36	52	46	9	2	2	19	4	
ES05	10,0	7,0	1,7	1,7	0,28	5,2	3,3	5,2	4,0	7,4	0,1378	53	57	56	9	2	2	21	4	
ES06	11,0	6,0	1,2	1,0	0,22	5,0	4,8	5,9	3,8	6,9	0,1425	57	46	49	11	2	2	19	2	
ES07	29,0	17,0	4,3	4,8	1,30	17,6	9,9	12,6	9,0	17,1	0,2233	62	103	101	7	5	5	23	4	
ES08	29,0	18,0	2,9	2,9	0,88	13,3	9,5	14,3	7,6	14,3	0,2185	32	94	94	12	8	5	22	3	
ES09	28,0	15,0	3,5	3,0	0,77	11,4	10,5	14,3	7,6	11,9	0,2280	43	100	95	11	7	4	22	3	
GA01	17,0	9,0	4,3	2,4	0,38	7,4	6,2	6,2	3,8	8,1	0,1678	43	71	71	7	2	2	20	4	
GA02	12,0	7,0	2,4	2,4	0,39	5,0	4,0	5,2	3,1	5,2	0,1425	35	58	54	10	2	2	21	4	
GA03	16,0	10,0	1,9	1,9	0,51	7,6	6,7	6,2	5,7	5,0	0,1568	34	65	65	12	2	2	22	4	
GA04	12,0	9,0	3,1	3,3	0,44	7,4	6,4	5,5	5,2	6,9	0,1739	36	65	65	12	2	2	21	5	
GA05	10,0	6,0	1,7	1,2	0,40	5,7	5,0	5,2	3,3	7,6	0,1615	32	51	50	8	2	2	21	3	
GA06	10,0	7,0	1,6	2,1	0,44	6,2	4,5	4,8	3,8	6,9	0,1663	31	53	50	10	2	2	18	3	
GA07	11,0	7,0	2,5	2,0	0,50	6,2	5,2	5,0	4,9	5,7	0,1900	35	61	61	11	2	2	17	3	
GA08	12,0	7,0	3,4	3,0	0,38	5,9	5,0	4,8	4,5	5,7	0,1853	34	60	59	11	2	2	22	3	
GA09	13,0	9,0	3,0	3,4	0,44	5,7	5,7	5,7	5,0	6,2	0,1710	37	58	58	12	2	2	20	11	
GA10	14,0	8,0	3,5	3,0	0,33	7,1	5,9	7,4	7,1	6,7	0,1710	47	61	63	12	2	2	21	5	
GA11	11,0	8,0	2,5	3,8	0,44	7,6	7,1	7,8	7,6	6,2	0,1568	35	62	55	9	2	2	22	7	
GA12	11,0	7,0	1,4	1,4	0,33	4,3	3,8	4,3	2,6	5,0	0,1520	31	52	44	11	2	2	17	2	
GA13	11,0	7,0	2,5	2,3	0,38	6,2	5,2	6,2	4,0	6,2	0,1378	44	55	54	13	2	2	19	4	
GR01	12,0	8,0	3,1	1,2	0,39	7,4	4,8	5,0	4,8	5,5	0,1758	26	45	45	12	2	2	18	7	
GR02	14,0	11,0	1,2	0,5	0,44	8,0	7,1	8,3	7,4	7,1	0,1758	38	59	54	13	2	2	16	4	
GR03	13,0	7,0	0,6	0,6	0,38	6,7	5,5	5,0	4,5	7,1	0,1092	45	74	70	9	2	2	15	2	
GR04	13,0	9,0	1,8	1,3	0,50	5,9	4,8	5,7	4,5	7,6	0,1852	37	47	45	17	2	2	19	5	
GR5	13,0	8,0	0,9	0,5	0,44	7,1	4,3	4,8	3,3	7,4	0,1805	42	60	59	10	2	2	21	4	
GR06	15,0	10,0	1,5	0,8	0,38	9,5	9,0	5,5	5,2	7,8	0,1948	50	59	55	9	2	2	26	3	
GR07	12,0	8,0	1,5	1,0	0,60	8,1	5,2	6,7	4,3	6,9	0,1853	42	64	62	16	2	2	20	3	
GR08	11,0	7,0	1,0	0,6	0,55	6,9	0,0	5,7	0,0	6,2	0,1758	39	48	46	12	1	1	17	0	
GR09	15,0	11,0	1,3	1,0	0,50	6,7	6,9	8,6	5,2	7,6	0,1663	42	54	52	12	2	2	19	5	
IR01	22,0	10,0	3,2	1,3	0,55	9,5	5,3	9,9	7,1	5,2	0,1710	28	93	90	7	2	3	21	2	



**Suplemento 4.** Dados brutos da análise morfométrica (continuação).

ID	Métricos										Merísticos									
	CC	LC	CSO	CSA	DTD	Od1	Od2	Oe1	Oe2	CE	DO	TO	VLd	VLe	FM	Gd	Ge	PLE	LT	
IR02	18,0	8,0	1,9	1,2	0,38	6,2	5,9	4,6	0,0	6,8	0,1615	30	105	99	6	2	1	24	8	
IR03	20,0	9,0	1,5	0,8	0,50	7,8	6,9	7,6	0,0	6,1	0,1378	26	91	91	7	2	1	17	4	
JP01	14,0	12,0	4,3	3,8	0,44	10,9	8,6	8,6	6,9	5,5	0,1568	37	80	88	9	2	2	24	8	
JP02	16,0	8,0	4,8	3,8	0,66	10,2	5,9	7,6	5,7	5,9	0,1662	61	85	85	10	2	2	25	4	
MA01	18,0	10,0	1,9	2,4	0,75	8,6	7,6	6,9	6,2	6,7	0,1378	27	63	62	7	2	2	24	3	
MR01	14,0	9,0	0,4	0,3	0,44	5,7	4,8	5,5	3,8	4,8	0,1178	45	53	46	14	2	2	17	6	
MR02	8,0	6,0	0,9	0,8	0,30	4,0	2,3	3,8	1,5	2,9	0,1254	33	47	40	13	2	2	18	6	
MR03	10,0	5,0	1,0	1,0	0,38	3,5	1,5	3,8	1,4	2,6	0,1302	39	40	36	11	2	2	17	5	
MR04	11,0	7,0	0,9	0,5	0,33	4,9	3,8	4,3	2,0	4,5	0,1254	42	45	40	12	2	2	17	4	
MR05	12,0	9,0	1,5	1,1	0,33	6,7	5,5	4,8	4,0	3,8	0,1150	43	58	58	12	2	2	18	8	
PA01	19,0	10,0	3,3	2,9	0,44	6,2	4,8	5,2	4,8	4,8	0,1406	35	66	59	8	2	2	22	1	
PA02	31,0	15,0	3,3	3,3	0,88	13,5	7,1	11,4	9,0	7,1	0,1995	37	100	99	7	3	2	26	4	
PA03	20,0	13,0	1,9	3,9	0,25	11,1	7,2	11,7	7,8	5,1	0,1948	54	95	98	7	2	2	21	5	
PA04	34,0	16,0	7,6	7,5	0,85	20,9	10,5	14,3	13,0	4,3	0,1900	37	111	103	15	4	2	25	1	
PA05	16,0	12,0	3,3	3,8	0,66	8,6	4,8	10,5	6,2	4,8	0,1948	42	85	87	13	3	2	24	3	
PA06	16,0	9,0	2,0	2,2	0,00	19,0	8,6	10,2	8,1	5,9	0,2423	0	102	93	9	5	2	23	4	
PA07	17,0	10,0	2,5	1,5	0,00	14,2	9,0	14,2	10,2	7,4	0,2280	0	106	99	12	3	2	19	2	
PA08	14,0	10,0	2,0	1,8	0,44	8,3	7,4	6,9	2,6	5,2	0,1995	50	80	75	8	2	2	19	3	
PA09	15,0	10,0	1,8	1,8	0,77	7,4	4,5	5,7	4,8	4,5	0,2233	0	94	98	7	4	2	23	1	
PA10	19,0	12,0	2,0	2,2	0,66	9,7	2,8	7,6	5,7	6,6	0,2043	31	104	91	10	4	2	24	1	
PA11	22,0	11,0	3,3	4,3	0,55	10,2	8,6	9,3	7,1	4,8	0,2138	35	95	92	11	4	2	24	1	
PA12	13,0	8,0	1,8	2,5	0,33	4,0	4,8	5,5	3,8	4,5	0,1425	37	58	58	13	2	2	20	2	
PA13	18,0	13,0	2,8	3,8	0,55	10,0	7,1	7,6	5,9	5,2	0,1948	49	98	90	9	4	3	28	1	
PE01	19,0	10,0	2,0	2,2	0,72	7,8	7,7	9,4	8,5	15,0	0,1948	76	83	79	5	2	2	20	4	
PE02	24,0	12,0	1,8	2,6	0,75	11,5	8,0	10,5	9,0	16,0	0,1853	85	127	125	5	2	2	21	4	
PE03	15,0	8,0	1,2	1,2	0,44	6,2	5,3	5,9	4,5	10,4	0,2185	65	90	79	7	2	2	22	4	
PE04	19,0	12,0	1,4	1,4	0,66	12,1	8,8	8,8	6,7	13,8	0,1976	103	116	119	7	2	2	20	4	
PE05	17,0	11,0	1,4	1,9	0,44	8,6	5,2	5,2	4,0	6,7	0,2109	64	85	83	7	2	2	22	2	
PE06	16,0	10,0	2,5	2,5	0,38	6,7	6,1	6,7	4,5	9,5	0,1758	61	57	55	14	2	2	25	6	
PE07	19,0	9,0	0,5	0,5	0,77	13,5	8,8	9,3	8,1	10,9	0,2138	84	100	96	7	2	2	23	6	
PE08	10,0	9,0	1,0	1,5	0,38	5,5	5,0	5,5	3,8	6,0	0,1617	61	45	42	14	2	2	27	4	
PE09	12,0	10,0	1,4	1,2	0,28	4,8	4,8	3,8	3,1	6,7	0,1663	43	57	43	12	2	2	20	4	
PE10	16,0	10,0	1,3	1,3	0,55	9,7	7,8	7,6	5,2	11,4	0,1995	98	93	83	10	2	2	18	4	
PR01	12,0	7,0	2,4	2,4	0,22	6,2	3,3	4,3	2,7	5,5	0,1805	71	80	63	5	2	2	17	3	
PR02	10,0	4,8	0,0	0,0	0,22	4,2	2,3	4,8	2,7	4,3	0,1282	29	0	0	10	2	2	15	1	
RJ01	11,0	8,0	1,1	2,1	0,44	5,2	4,8	5,2	3,1	5,2	0,1710	25	48	49	11	2	2	16	15	
RJ02	11,0	7,0	1,1	0,6	0,55	5,2	4,3	5,0	2,9	8,1	0,1758	43	63	53	7	2	2	18	5	
SI01	13,0	6,0	0,5	0,5	0,55	5,2	4,8	5,9	3,8	5,5	0,1568	35	58	47	9	2	2	19	4	
SI02	9,0	5,0	2,0	1,5	0,55	3,6	2,9	4,5	2,4	4,3	0,1520	27	59	67	10	2	2	17	3	
SI03	12,0	7,0	2,9	2,4	0,50	5,9	4,8	7,1	2,9	5,5	0,1568	44	66	75	11	2	2	19	14	
SI04	10,0	7,0	1,7	1,9	0,55	3,6	3,3	4,5	3,3	3,6	0,1378	29	67	60	9	2	2	20	9	
SI05	9,0	4,0	1,9	1,9	0,38	4,3	3,8	3,8	3,3	4,3	0,1520	27	54	53	10	2	2	19	1	
SI06	9,0	4,0	0,5	0,4	0,27	3,3	2,8	4,3	2,4	3,3	0,1416	24	45	48	8	2	2	17	1	
SI07	8,0	4,0	0,8	1,5	0,38	3,1	2,8	3,6	1,9	3,1	0,1330	30	50	52	8	2	2	18	3	
SI08	7,0	4,0	1,4	0,5	0,33	2,6	2,4	3,3	2,1	3,8	0,1045	22	42	45	7	2	2	15	2	
SP01	17,0	10,0	1,0	1,0	0,64	9,0	6,7	7,7	4,3	8,1	0,1662	44	70	66	8	2	2	25	4	
SP02	19,0	12,0	1,9	1,9	0,45	9,0	8,1	6,7	6,4	8,7	0,1615	40	80	76	9	2	2	13	5	
SP03	18,0	13,0	1,3	2,0	0,44	9,5	6,9	7,1	5,2	8,6	0,1615	51	59	55	17	2	2	23	5	
SP04	17,0	8,0	1,7	1,0	0,72	8,6	6,9	6,6	4,8	9,5	0,1568	41	75	70	14	2	2	19	4	
SP05	17,0	11,0	2,5	1,5	0,77	7,6	5,9	7,5	5,9	9,0	0,1615	37	68	67	12	2	2	23	4	
SP06	16,0	8,0	0,8	0,5	0,60	8,6	7,6	10,9	6,4	10,2	0,1900	60	87	74	12	2	2	23	3	
SP07	22,0	12,0	0,5	0,5	1,00	17,1	12,3	13,8	12,8	15,2	0,1900	109	118	110	9	2	2	19	27	

**Suplemento 4.** Dados brutos da análise morfométrica (continuação).

ID	Métricos											Merísticos								
	CC	LC	CSO	CSA	DTD	Od1	Od2	Oe1	Oe2	CE	DO	TO	VLd	VLe	FM	Gd	Ge	PLE	LT	
SP08	18,0	10,0	0,8	0,5	0,66	12,6	7,1	10,7	9,0	12,8	0,1805	85	93	81	7	2	2	20	1	
SP09	17,0	9,0	3,0	3,0	0,72	10,2	8,8	12,4	7,6	9,9	0,1378	39	73	71	8	2	2	20	1	
SP10	11,0	7,0	1,8	2,0	0,44	3,8	3,3	4,8	2,4	3,8	0,1568	34	77	71	14	2	2	22	3	
SP11	9,0	6,0	0,8	1,5	0,44	4,3	4,0	4,5	3,3	5,2	0,1473	23	61	53	10	2	2	21	2	
SP12	12,0	7,0	1,8	0,8	0,50	7,1	4,8	5,0	4,8	6,2	0,1425	25	67	63	12	2	2	24	6	
ST01	11,0	8,2	1,5	1,5	0,28	4,3	2,5	4,5	4,3	4,5	0,1387	22	62	54	10	2	2	19	5	
ST02	14,0	10,0	1,3	1,3	0,50	6,2	4,7	6,2	4,3	5,4	0,1444	48	70	62	12	2	2	20	5	
ST03	15,0	7,0	0,8	0,8	0,50	5,9	5,5	6,4	3,5	8,6	0,1425	39	69	69	12	2	2	22	4	
ST04	9,0	6,0	0,9	1,3	0,28	5,5	5,2	5,9	0,0	6,2	0,1425	34	56	62	12	1	2	16	5	
ST05	12,0	7,0	0,4	0,4	0,38	7,4	0,0	6,2	2,5	7,4	0,1416	25	56	61	13	2	1	18	3	

**Suplemento 5.** Matriz de caracteres discretos e respectivos estados.

AR0 1	00000000000100100	ES0 4	0010000000000001	PA08	1000000000020011
AR0 2	00000000000100100	ES05	0010000000000001	PA09	100010000002000?
AR0 3	00000000001000100	ES06	0000000000000101	PA10	100010000002000?
AR0 4	0000001001100010	ES07	1001110111030000	PA1 1	1000100010020001
AR05	00100000000000110	ES08	1001110110030001	PA12	1000000000000001
AR06	00000000000000000	ES09	1001110110030001	PA13	1000110010020001
AR07	00000000000000110	GA0 1	0000000000011100	PE0 1	0000000000010100
AN0 1	00000030010000000	GA0 2	0000000000011100	PE0 2	0000000000010100
AN0 2	00000010000000000	GA0 3	0000000000011100	PE0 3	0000000000040?00
AN0 3	00000030000000000	GA0 4	0000000000011100	PE0 4	0000000000040?00
AN0 4	00000020010001000	GA05	0000000000011100	PE05	0000000000000000
AN05	00000010000000000	GA06	0000000000011100	PE06	0000000000000000
AN06	00000010000000000	GA07	0000000000011100	PE07	0000000000040100
AN07	00000020000000000	GA08	0000000000011100	PE08	0000000000000100
AN08	00000000000000100	GA09	0000001000011100	PE09	0000000000020000
BA0 1	00000010000000100	GA10	0000000000011100	PE10	0000000000020000
BA0 2	00000000000021111	GA1 1	0000001000011100	PR0 1	0000000000020000
BA0 3	00000000000021111	GA12	0000000000011100	PR0 2	011000000000010?
BA0 4	00000000000021111	GA13	0000000000011100	RJ0 1	0000002000001100
BA05	00000000000021100	GR0 1	1000001000041100	RJ0 2	0000000000020000
BA06	00000000000021100	GR0 2	1000000000041100	SI0 1	0000000000000001
BA07	0??000?000021100	GR0 3	1000000000041100	SI0 2	0000000000020001
BA08	0000001000021100	GR0 4	1010000000041100	SI0 3	0000002000020001
BA09	00000000000021100	GR05	1010000000041100	SI0 4	0000001000020001
BA10	0000001000021102	GR06	1000000000040000	SI05	0110000000020000
BA1 1	00000010000000100	GR07	1000000000040000	SI06	0110000000020001
CE0 1	00100000000000100	GR08	1??0000000041100	SI07	0000000000020001
CE0 2	01100000000000000	GR09	1010000000041100	SI08	0000000000020001
CE0 3	01100000000000000	IR0 1	0000010001000000	SP0 1	1000000000020001
CE0 4	01100000000000100	IR0 2	0000001000000000	SP0 2	1000000000110000
CE05	01000000001000001	IR0 3	0000000000100000	SP0 3	1010000000010000
CE06	01100000000000001	JP0 1	0110001000100001	SP0 4	1010000000010000
CE07	01100000000000000	JP0 2	0110000000100001	SP05	1010000000010000
CE08	00000010000000001	MA0 1	0000000000000000	SP06	1110000000010000
CE09	01100000000000000	MR0 1	0000000000000100	SP07	1000003000010000
CE10	01100000000000001	MR0 2	000000000000?111	SP08	1000000000010000
CE1 1	00000000000000000	MR0 3	0000000000000111	SP09	1000000000000000
CE12	00000000000000001	MR0 4	0000000000000111	SP10	1000000000000001
CR0 1	00000010000000110	MR05	0000001000000110	SP1 1	1000000000000000
CR0 2	00000010000000110	PA0 1	1010000000000100	SP12	1000000000000000
CR0 3	00000000000000110	PA0 2	1000100001020001	ST0 1	0000000001000100
CR0 4	00000000000000110	PA0 3	1??0000000020001	ST0 2	0000000001000112
CR05	0??000?000000110	PA0 4	1010100000020001	ST0 3	0000000001040110
ES0 1	00000000000000100	PA05	1000100000020001	ST0 4	0000000000040110
ES0 2	00100000000000100	PA06	100010000002000?	ST05	0000000000040110
ES0 3	00100000000100101	PA07	100010000002000?	OUT	000000?10104000?

Correção gramatical e de estilo  
**Maria do Desterro Brisolla Maciel Barros**  
Especialista em Língua Portuguesa